

黄芩苷在中国对虾体内对诺氟沙星消除及细胞色素 P450 酶的影响

李 健¹, 梁俊平^{1,2}, 李小彦^{1,2}, 李吉涛¹, 常志强¹, 戴芳钰¹, 赵法箴^{1,2}

(1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国海洋大学 水产学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 对照组中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)连续投喂不含药物饵料, 诺氟沙星组和联合用药组以 50 mg/kg 体质量剂量连续投喂含诺氟沙星药饵 5 d 后, 诺氟沙星组投喂不含药物饵料 10 d, 联合用药组以 100 mg/kg 体质量剂量投喂含黄芩苷饵料 10 d。从投喂诺氟沙星药饵时开始, 在不同时间点采集中国对虾血液、肝胰腺、鳃和肌肉组织进行药物残留和肝药酶活性测定。结果表明: 与诺氟沙星组相比, 联合用药组各组织中诺氟沙星消除较快, 血淋巴、肝胰腺、鳃和肌肉的理论休药期比诺氟沙星组分别缩短了 23.92%、22.73%、25.92%和 21.92%; 与对照组相比, 诺氟沙星对中国对虾 CYP1A(ECOD)和 CYP2(APND)酶活性有一定的抑制作用, 但随着诺氟沙星的消除抑制作用逐渐减弱, 最后恢复至对照水平; 黄芩苷在加速诺氟沙星在中国对虾体内消除的同时, 对中国对虾 CYP450 酶也有较强的诱导作用。因此, 药物使用应注意药物之间的相互作用, 以免造成药物中毒或疗效下降现象。

关键词: 黄芩苷; 诺氟沙星; 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*); CYP450

中图分类号: S948

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2012)03-0081-08

诺氟沙星属第三代氟喹诺酮类药物, 具有抗菌谱广、抗菌力强等特点, 已广泛用于水产动物细菌性疾病的防治, 但是有研究表明此类药物在食品动物中的残留会引起人类病原菌对其产生耐药性, 药物产生的毒副作用还会对人体产生直接的危害, 因而其残留问题已日益引起人们关注^[1]。

中草药是一种“绿色渔药”, 药源广、成本低, 具有低毒、低抗药性等特点, 而且具有增强机体免疫力的作用, 其中从唇形科(Labiatae)植物黄芩(*Scutellaria baicalensis* Georigi)的干燥根中提取出的黄酮类化合物黄芩苷具有保肝、利胆、抗菌消炎等多种药理作用^[2], 已逐渐应用于水产养殖业中细菌性疾病的防治。并且以诺氟沙星和黄芩苷为主要成分的“诺黄散”复方制剂已成为水产常用药物, 中西药结合已展现出良好的应用前景。但关于中草药对西药在水产动物体内消除的影响还鲜见报道, 仅见张海珍等^[3]研究发现三黄散对复方新诺明在大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)体内的消除有一定的促进作用。而目前还未见黄芩苷对喹诺酮类药物在甲壳动物体内消除的影响的报道, 尤其在联合用药时对甲壳动物细胞色素 P450 酶(CYP450)的影响研究甚少。

CYP450 作为混合功能氧化酶系中最重要的一族, 参与众多药物在动物体内的生物转化, 特别是 CYP1A 和 CYP2 参与约 60%的前致癌物、前毒物以及临床药物的代谢^[4-5], 其活性高低可直接影响到药物的治疗效果, 甚至会产生毒性作用。本试验将探讨黄芩苷与诺氟沙星在中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)体内的相互作用, 并依据 CYP1A 和 CYP2 酶活性变化评价联合用药的安全性, 以期指导药物临床配伍和安全用药。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 实验动物

健康中国对虾, 购自胶州宝荣水产科技发展有限公司, 平均体长(7.81±0.88)cm, 平均体质量

收稿日期: 2011-03-02; 修订日期: 2011-09-15

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(nyhyzx07-042, 200803012); 农业科技成果转化资金项目(2010GB23260589); 国家虾产业技术体系(nycyt-46)资助

作者简介: 李健(1961-), 男, 博士 研究员, 主要从事海水健康养殖技术研究, 电话: 0532-85830183; E-mail: lijian@ysfri.ac.cn

(5.20±1.47)g, 试验前无用药史, 试验前暂养1周, 每日投喂不含药物的配合饲料, 试验用水为自然海水, 盐度 30, pH 8.2, 试验期间每天换水一次, 充气, 水温(30±1)℃。

1.1.2 药品与试剂

诺氟沙星原粉由武汉刚正生物科技有限公司提供(含量 94.78%), 诺氟沙星标准品购自 Sigma 公司(批号: 70458-96-7, 含量 98%), 黄芩苷药粉(购自胶南科奥植物制品有限公司, 含量 85%)。甲醇、乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 分组与采样

试验分为对照组、诺氟沙星组和联合用药组。对照组中国对虾连续投喂不含药物饵料, 诺氟沙星组和联合用药组以 50 mg/kg 体质量剂量连续投喂含诺氟沙星药饵 5 d 后, 诺氟沙星组投喂不含药物饵料 10 d, 联合用药组以 100 mg/kg 体质量剂量投喂含黄芩苷饵料 10 d^[6]。饵料投喂每天 2 次, 投喂时间为 7 时和 16 时。

从投喂药饵时开始计时, 每个时间点随机取中国对虾各 8 尾, 各组分别于 5、6、7、8、9、10、11、13、15 d 取血淋巴、肝胰腺、鳃和肌肉置-20℃保存用于药物残留测定; 同时各组分别于 1、5、6、7、9、11、13、15 d 取肝胰腺放入液氮保存, 用于 CYP450 酶活性测定。

1.2.2 样品处理及检测条件

组织处理: 分别准确称取肌肉 0.5 g, 肝胰腺 0.2 g, 鳃 0.1 g, 加入 2 mL 乙腈, 用高速分散器匀浆, 再用 2 mL 乙腈清洗刀头, 合并提取液, 充分振荡, 5 000 r/min 离心 10 min, 取上清液。再用 2 mL 乙腈重复提取 1 次, 合并两次提取液, 40℃水浴氮气吹干, 加 1 mL 流动相, 再加 1 mL 正己烷, 充分混匀, 下层溶液过 0.22 μm 滤膜后进行高效液相色谱测定。

血淋巴处理: 室温下自然解冻, 摇匀后吸取 1 mL 血浆于 10 mL 离心管中, 加入 2 mL 乙腈漩涡振荡 10 s, 静置 2 h, 5 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 在 40℃恒温水浴下氮气吹干, 残渣用 1 mL 流动相溶解, 0.22 μm 滤膜过滤后进行高效液相色谱测定。

检测条件: Agilent Tc-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相, 乙腈: 磷酸(0.01 mol/L, 用三乙胺调至 pH 3.42)=82 : 18(v : v); 荧光检测器, 激发波长 278 nm, 发射波长 460 nm; 柱温 30℃; 流速

0.8 mL/min; 进样量 20 μL。

1.2.3 标准曲线与最低检测限

准确称取诺氟沙星标准品, 以色谱纯乙腈溶解, 临用前用流动相稀释成 0.01、0.05、0.1、0.5、1、2、5、10、20 μg/mL 9 个系列质量浓度的标准溶液, HPLC 检测, 以药品峰面积对相应的浓度作线性回归, 绘出标准曲线, 得出回归方程和相关系数。

1.2.4 回收率与精密度的测定

取浓度为 0.05、0.1、1、5、10 μg/mL 的诺氟沙星标准溶液加入中国对虾血淋巴、肝胰腺、鳃和肌肉组织中, 然后按“样品处理”方法处理后测定, 每个浓度设 3 个重复, 测得各样品峰面积按标准曲线方程计算浓度, 然后与理论浓度相比较。

$$\text{回收率} = \frac{\text{样品实测药物浓度}}{\text{样品理论药物浓度}} \times 100\%$$

以上 4 个浓度的样品于 1 d 内不同时间分别进样 5 次和分 5 d 重复测定, 计算各组织中不同浓度水平相应峰面积的日内平均变异系数和日间平均变异系数。最低检测限参照梁俊平等^[7]的方法确定。

1.2.5 酶活性的测定

S9 制备: 肝胰腺 S9 的制备参照文献[8]改进的方法进行, 用预冷的缓冲液反复冲洗, 尽可能除去血细胞, 用滤纸吸干称质量, 并按 1 : 5(W/V)的比例加入预冷的匀浆缓冲液(0.1 mol/L pH7.5 PBS, 含 1 mmol/L EDTANa₂, 1 mmol/L PMSF, 1 mmol/L PTU, 0.1 mmol/L DTT, 15%甘油), 将肝胰腺转入手动匀浆器匀浆, 将匀浆液离心(4℃, 13 500 g, 25 min), 上清液用两层已被 PBS 缓冲液润湿过的纱布过滤, 将漂浮的脂类物质除去, 即制成 S9 部分, 分装于离心管中, 置于液氮中保存备用。蛋白含量的测定参照 Brandford 的 G-250 方法^[9]。

氨基比林-N-脱甲基酶(APND)活性的测定: 参照文献[10]改进的方法进行, 取 0.1 mol/L PBS (pH=7.5) 1.7 mL, 加 S9 部分 0.1 mL, 氨基比林(24g/L) 0.1 mL, 25℃水浴 2 min 后, 测定管加 10 mmol/L NADPH 0.1 mL, 空白管加双蒸水 0.1 mL, 25℃水浴 30 min。各管加 ZnSO₄ 0.35 mL, 混匀, 冰浴 5 min, 加饱和 Ba(OH)₂ 20.35 mL, 混匀, 室温放置 5 min 后 5000 r/min 离心 10 min, 取上清 2 mL, 加 Nash 试剂 2 mL, 以后操作同甲醛标准曲线的制备。根据 OD₄₂₀ 值和甲醛标准曲线计算酶活性, 以 nmol/min/mg 蛋白表示。甲醛标准曲线的制备参照 Nash 比色法进行^[11]。

乙氧基香豆素-*O*-脱乙酰酶(ECOD)活性的测定: 参照文献[12]改进的方法进行, 反应在 96 孔酶标板黑板中进行。反应过程如下: 取 0.1 mol/L PBS 匀浆缓冲液(含 2 mM7-乙氧基香豆素)140 μL, 加入 S9 部分 10 μL, 在 27 °C 条件下孵育 5 min, 测定管加 10 mmol/L NADPH 10 μL, 空白管加缓冲液, 立即进行荧光测定。反应在动力学条件下进行 24 个循环, 每 56 s 一个循环。于缓冲液中加入 0-500 pM7-羟基香豆素制作标准曲线。

1.2.6 数据统计

酶活数据使用 SPASS11.5 软件进行分析, 药物数据采用 Microsoft Excel 2003 软件拟合, 绘制药时曲线图和消除曲线图, 求出消除速率常数(β)和消除曲线方程, 计算消除半衰期($t_{1/2\beta}$)。

1.2.7 休药期的计算

诺氟沙星是按一级动力学在体内消除的, 即在消除相服从指数消除: $C_i = C_0e^{-\beta t}$, 根据消除相测定的组织药物浓度及规定的最高残留限量(MRL), 计算各组织药物浓度降至规定水平所需时间^[13]:

$$T = \frac{\ln(C_0 / MRL)}{\beta}$$

2 试验结果

2.1 线性范围和最低检测限

诺氟沙星标准液在 0.01~10 μg/mL 质量浓度范围内有良好的相关性, 线性回归方程为 $Y=1035X+49.822$, 相关系数 $R^2 = 0.9999$, 最低检测限为 0.01 μg/mL。

2.2 回收率及精密度

在 0.05~10 μg/mL 范围内诺氟沙星在中国对虾血

液及肝胰腺、肌肉、鳃几种组织中的回收率分别为 81.22%~110.25%、76.44%~108.97%、71.59%~98.94%、76.45%~99.65%(表 1)。所有样品的日内变异系数为 3.59%~4.63%, 日间变异系数为 3.87%~5.07%。

2.3 两种给药方案下诺氟沙星在中国对虾体内的消除

两种给药方案下诺氟沙星在中国对虾体内的消除情况如图 1 所示, 中国对虾连续 5 d 投喂诺氟沙星后, 联合用药组 4 种组织中诺氟沙星含量与诺氟沙星组无明显差异($P>0.05$); 从第 8 天开始, 联合用药组中国对虾 4 种组织中诺氟沙星含量明显低于诺氟沙星组($P<0.05$), 同时在各组织中, 联合用药组药物浓度消除速率快于诺氟沙星组, 下降到检测限以下的时间少于诺氟沙星组 2~4 d。

2.4 诺氟沙星在中国对虾体内的消除曲线方程和参数

由表 2 可以看出, 诺氟沙星与黄芩苷合用后其在各组织中的消除半衰期明显缩短, 说明黄芩苷对诺氟沙星在中国对虾体内的消除有促进作用。

2.5 诺氟沙星在中国对虾体内的休药期

过量的喹诺酮类药物残留易诱发细菌耐药性, 给人体健康带来危害, 欧盟和北美等国家已禁止诺氟沙星在水产养殖业中使用^[14]。欧盟对氟喹诺酮类药物(恩诺沙星、达氟沙星)在食品动物中最高残留限量的规定: 肌肉 100 μg/kg、肝和肾 200 μg/kg; 家禽及猪可食组织 50 μg/kg, 而在水产品中的 MRL 尚未明确规定。以最高残留限量以 50 μg/kg 计, 联合用药组各组织的理论休药期比诺氟沙星组分别缩短了 23.92%、22.73%、25.92%、21.92%, 如表 3 所示。

表 1 诺氟沙星在中国对虾血淋巴及各组织中的回收率

Tab. 1 Recovery of norfloxacin in hemolymph and various tissues of *Fenneropenaeus chinensis*

质量浓度 (μg/mL)	回收率 (%)			
	血淋巴	肝胰腺	肌肉	鳃
0.05	110.25±8.85	108.97±5.37	98.94±4.77	99.65±6.52
0.1	91.30±5.33	99.96±1.08	84.98±2.74	92.33±5.33
1	90.32±1.79	76.44±6.04	71.59±1.22	80.04±3.57
5	88.31±3.26	81.06±7.92	72.82±4.60	76.66±6.86
10	81.22±4.13	77.04±5.43	71.88±4.70	76.45±7.06

2.6 中国对虾肝胰腺 ECOD、APND 酶活性变化

由图 2 可以看出, 在 7 d 前诺氟沙星组和联合用

药组 ECOD 酶活性虽有一定的波动, 但与对照组相比均无显著性差异($P>0.05$), 在第 9 天和第 11 天时诺氟沙星组酶活性已极显著低于对照组水平($P<0.01$),

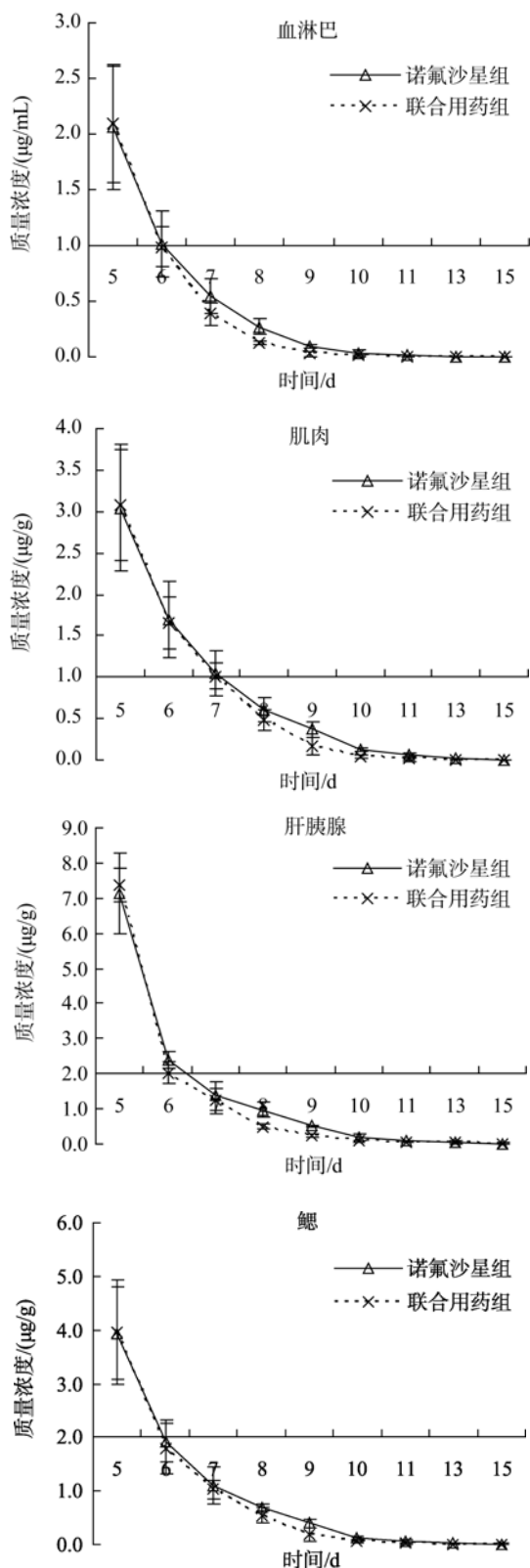


图 1 两种给药方案诺氟沙星在中国对虾血淋巴和各组织中的药物浓度变化曲线

Fig. 1 The concentration of norfloxacin in hemolymph and various tissues of *Fenneropenaeus chinensis* at two dosage regimens

而联合用药组 ECOD 酶活性直到 11 d 时才显著低于对照组水平。到 15 d 时诺氟沙星组酶活性恢复到了对照组水平，而联合用药组酶活性已极显著高于对照组水平 ($P < 0.01$)。

由图 3 可以看出，与对照组相比，诺氟沙星组和联合用药组 APND 酶活性均呈先降低后逐渐升高的趋势。在中国对虾投喂诺氟沙星 5 d 内，诺氟沙星组和联合用药组酶活性与对照组相比无明显差别，在第 6 天和第 7 天时两试验组酶活性均显著低于对照组水平 ($P < 0.05$)，之后诺氟沙星组酶活性逐渐恢复到对照组水平，而联合用药组酶活性恢复到对照组水平后继续升高，在 13 d (即投喂黄芩苷 8 d) 时已显著高于对照组水平 ($P < 0.05$)，第 15 天 (即投喂黄芩苷 10 d) 时酶活性已极显著高于对照组水平 ($P < 0.01$)。

3 讨论

3.1 黄芩苷对诺氟沙星在中国对虾体内消除规律的影响

由图 1 可看出，中国对虾连续 5 d 口服诺氟沙星后，药物在各组织中的分布为肝胰腺 > 鳃 > 肌肉 > 血淋巴，药物在肝胰腺中残留最多，这是口服给药后药物分布的主要特征。而鳃作为对虾的呼吸器官，与水环境直接接触，药物分布也较多，说明对虾与一些鱼类一样，鳃也是药物排泄的重要器官之一^[15]。同时由图 1 也可看出，从第 8 天开始，联合用药组各组织中的药物浓度明显低于诺氟沙星组，另由表 2、表 3 可知，投喂黄芩苷后诺氟沙星的消除半衰期以及在各组织中的休药期均明显缩短。孙铭等^[16]以 30 mg/kg 体质量剂量连续投喂中国对虾诺氟沙星后，药物在血淋巴、肝胰腺和肌肉中的消除半衰期分别为 21.74、32.75 和 31.01 h，与本试验诺氟沙星组相近，小于本试验联合用药组，说明黄芩苷对诺氟沙星在对虾体内代谢、消除过程中发挥了诱导作用。

药物在动物体内的吸收与消除主要是通过一些转运蛋白来完成的，其中磷酸糖蛋白 (P-gp) 作为一种能量 (ATP) 依赖性的多种药物排出泵，对于药物的代谢和清除起着十分重要的作用，已被证实其在细胞内的过度表达可导致药物流出增加。而 P-gp 的表达主要通过多种蛋白激酶介导的磷酸化或去磷酸化来调节，在许多细胞系中，蛋白激酶 C 可增加 P-gp 磷酸化，然而 cAMP 依赖性激酶既不同于 PKC，也不同于蛋白激酶 A 的其他激酶，它同样也可介导 P-gp 的磷酸化^[17]。已有研究证实，黄芩苷虽对 PKC 有一

表 2 诺氟沙星在中国对虾体内的消除曲线方程和参数

Tab. 2 The equations of elimination curves and parameters of norfloxacin in *Fenneropenaeus chinensis*

组织	试验分组	消除方程	消除速率常数 (β)	相关系数 (R^2)	消除半衰期(h) $t_{1/2\beta}$
血淋巴	诺氟沙星组	$C(t) = 2.4535e^{-0.8331 t}$	0.8331	0.9933	19.96
	联合用药组	$C(t) = 2.7396e^{-1.1149 t}$	1.1149	0.9915	14.92
肝胰腺	诺氟沙星组	$C(t) = 5.3526e^{-0.6100 t}$	0.6100	0.9803	27.27
	联合用药组	$C(t) = 6.2138e^{-0.8061 t}$	0.8061	0.9732	20.63
鳃	诺氟沙星组	$C(t) = 3.591e^{-0.6225 t}$	0.6225	0.9775	26.72
	联合用药组	$C(t) = 4.6269e^{-0.8728 t}$	0.8728	0.9825	19.06
肌肉	诺氟沙星组	$C(t) = 3.373e^{-0.6736 t}$	0.6736	0.9753	24.69
	联合用药组	$C(t) = 3.8978e^{-0.8816 t}$	0.8816	0.9649	18.87

表 3 诺氟沙星在中国对虾各组织中的理论休药期(d)

Tab. 3 The withdrawal periods of norfloxacin in various tissues of *Fenneropenaeus chinensis* (d)

试验分组	血淋巴	肝胰腺	鳃	肌肉
诺氟沙星组	7.44	11.44	10.57	9.67
联合用药组	5.66	8.84	7.83	7.55

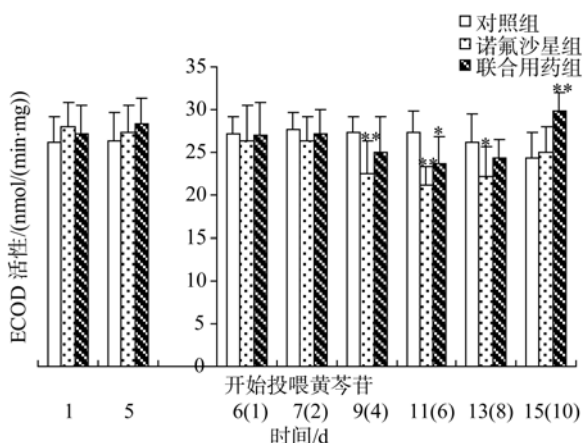


图 2 两种给药方案下中国对虾肝胰腺 ECOD 活性变化与对照组比较

Fig. 2 The change of ECOD activities in hepatopancreas of *Fenneropenaeus chinensis* at two dosage regimens compared with the control group
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 8$

定的抑制, 但对 cAMP、cGMP、PKA 和 PKG 活性有明显促进作用^[18], 在中国对虾体内 cAMP 等激酶可能受到黄芩苷诱导而使 P-gp 磷酸化, 在细胞内过度表达从而主动将药物转运出细胞, 最终排到体外, 从而表现出联合用药组诺氟沙星的消除速率快于诺氟沙星组。

3.2 中国对虾体内 CYP450 酶活性的变化

CYP1A 常被作为环境毒理学中的生物标志物来

进行研究, 在甲壳动物中代表 CYP1A 的 ECOD 活性常被用来鉴定环境污染状况^[19]。对诺氟沙星组来说, 中国对虾连续投喂诺氟沙星 5 d 后 ECOD 酶的活性没有立即表现出抑制作用, 而是在第 9 天(停药后第 4 天)才表现出极显著的抑制作用($P < 0.01$), 而且抑制作用一直持续到第 13 天, 说明诺氟沙星对 ECOD 酶的抑制作用需经一定时间才能表现出来, 而且抑制作用持续时间较长。对联合用药组来说, 诺氟沙星的抑制作用直到第 11 天, 即投喂黄芩苷药饵后的第 6 天才表现出来($P < 0.05$), 可能是因为投喂黄芩苷后对诺氟沙星发挥抑制作用起到了阻碍作用。而黄芩苷对酶的诱导作用直到第 15 天时才表现出显著差异($P < 0.01$), 可能是由于诺氟沙星“抑制后效应”延缓了黄芩苷的诱导作用。

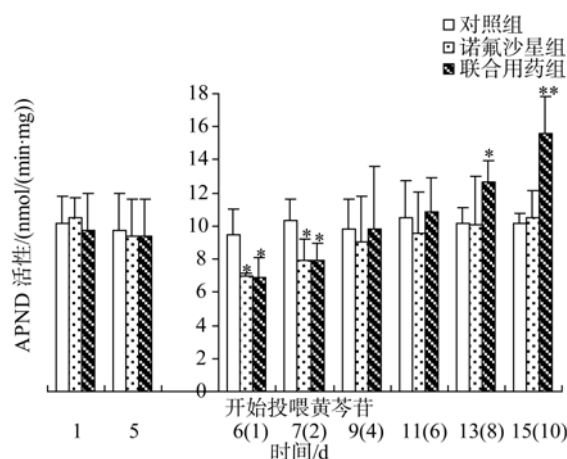


图 3 两种给药方案下中国对虾肝胰腺 APND 活性的变化与对照组比较

Fig. 3 The change of APND activities in hepatopancreas of *Fenneropenaeus chinensis* at two dosage regimens compared with the control group
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 8$

在脊椎动物中, APND 活性主要反映 CYP2 家族同工酶的活性。然而在甲壳动物中, 特定底物反应的酶活性并不一定能反映特定的 CYP450 亚家族的活性, 因此 APND 活性变化规律可能只是反映了 CYP2 家族酶活性的变化^[20]。如图 3 所示, 中国对虾在投喂诺氟沙星药饵后 APND 酶的活性有不断降低的趋势, 在第 6 天时已显著低于与对照组水平($P<0.05$), 说明诺氟沙星也需要一定时间才对 APND 酶表现出抑制作用, 但要快于 ECOD 发挥抑制效应的时间。韩华等^[21]研究也发现牙鲆口灌诺氟沙星 5 天后, APND 酶活性才表现出极强的抑制作用。在第 7 天时诺氟沙星组 APND 酶的活性仍表现出明显的抑制作用($P<0.05$), 之后诺氟沙星组酶活性逐渐恢复到对照组水平; 而联合用药组酶活性恢复到对照组水平后继续升高, 到第 15 天(即投喂黄芩苷 10 d)时酶活性已极显著高于对照组水平($P<0.01$)。说明诺氟沙星对 APND 酶的活性也具有一定的“抑制后效应”, 但黄芩苷对 APND 酶活性的诱导则要快于对 ECOD 酶活性的诱导。

3.3 中国对虾体内 CYP450 的诱导和抑制与联合用药

CYP450 酶是微粒体混合功能氧化酶系中最重要的—族氧化酶, 参与许多内源性和外源性物质的生物转化, 在调节机体与外界环境的相互作用以及保持机体内环境的稳态中起着十分重要的作用。关于 CYP 的诱导机制在哺乳动物中研究已比较清楚, 主要诱导机制可分为激活基因转录水平、增加 mRNA 稳定性或增强部分蛋白稳定性等几种。已有研究表明, 黄芩苷可选择性诱导小鼠 CYP1A1、CYP2B1、CYP2C11, 可使其酶蛋白含量及活性升高^[17,22]。韩华等^[23]研究也发现黄芩苷对牙鲆 CYP1A 酶活性升高与 mRNA 表达增加具有一定的相关性。本试验中黄芩苷对 CYP1A 和 CYP2 酶活性的诱导可能也是通过增强 mRNA 表达而实现的, 但需进一步证实。

关于 CYP450 的抑制普遍认为主要发生在酶蛋白水平上, 由抑制剂占据被抑制酶的一定部位, 从而使酶代谢其他底物的活性减弱^[5]。关于喹诺酮类药物对 CYP450 的抑制机理尚未完全明了, 一种假说认为, 其抑制作用和它们自身的分子组成及空间构象有关, 药物以竞争性或混合竞争性方式有选择性地抑制 CYP450 酶活性; 另一种假说认为, 喹诺酮类

抗菌药物对肝药酶的抑制作用依赖于它们在体内的代谢程度和 4-氧代谢物的生成量^[24]。本试验中诺氟沙星对 CYP1A 及 CYP2 的抑制随着药物的消除而逐渐恢复到了正常水平, 推测诺氟沙星对 CYP1A 及 CYP2 的抑制可能属于常见的竞争性抑制, 诺氟沙星只是结合了酶活性中心以外的位点。

CYP450 的诱导和抑制一方面可改变一些药物和环境化合物在体内的毒性, 另一方面可引起治疗药物的效应改变。由于长期的进化, 生物体内的 CYP450 主要与外源性物质的代谢有关, 但不少内源性物质的代谢也离不开 CYP450, 内源性物质的代谢一般与维持机体内环境稳态有密切关系^[21]。因此在中国对虾养殖过程中, 如果诺氟沙星使用不当可能会造成长时间抑制中国对虾 CYP450 的活性, 或对 CYP450 造成不可逆性抑制, 从而可能会阻碍其对内源性物质的代谢, 甚至会使内源性物质过多积累而产生不良反应, 同时也可能会造成受 CYP450 代谢的外源药物积累而出现中毒现象。而 CYP450 受黄芩苷诱导时, 可能会加快某种受 CYP450 代谢药物的代谢速率, 从而影响这种药物在体内的浓度而降低治疗效果。因此在诺氟沙星和黄芩苷联合用药时应充分考虑用药剂量及用药时间, 尤其在复方制剂中应特别注重两种药物间的配伍比例, 以免造成药物中毒或疗效下降现象。

参考文献:

- [1] 邓国东, 杨桂香, 陈杖榴. 氟喹诺酮类药物在动物性食品中的残留检测研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2000, 34(3): 53-58.
- [2] 文敏, 李雪, 付守廷. 黄芩苷药理作用研究新进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2008, 25(2): 158-162.
- [3] 张海珍, 李健, 王群, 等. 中草药对复方新诺明在大菱鲆体内残留消除的影响[J]. 农业环境科学学报, 2008, 27(5): 2096-2100.
- [4] 胡云珍, 姚彤伟. 细胞色素 P4501A 的研究进展[J]. 中国药学杂志, 2003, 38(4): 246-250.
- [5] 周宏灏. 遗传药理学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2003: 61-99.
- [6] 农业部《新编渔药手册》编撰委员会. 新编渔药手册[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 205-323.
- [7] 梁俊平, 李健, 张喆, 等. 肌注和口服恩诺沙星在大菱鲆体内的药代动力学比较[J]. 水生生物学报, 2010,

- 34(6): 1122-1128.
- [8] 沈钧, 徐佩佩, 金锡鹏. 肝脏中细胞色素 P450 测定方法的改进[J]. 工业卫生与职业病, 1997, 23(4): 236-238.
- [9] Brandford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254.
- [10] Schenkman J B, Remmer H, Estabrook R W. Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome[J]. Molecular Pharmacology, 1967, 3(2): 113-123.
- [11] Nash T. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction [J]. Biochemical Journal, 1953, 55(3): 416-421.
- [12] Oberdörster E, Brouwer M, Hoexum-Brouwer T, et al. Long-Term pyrene exposure of grass shrimp, *Palaeomonetes pugio*, affects molting and reproduction of exposed males and offspring of exposed females[J]. Environmental Health Perspectives, 2000, 108(7): 641-646.
- [13] 刘玉林, 王翔凌, 杨先乐, 等. 诺氟沙星在大黄鱼体内的药代动力学及残留研究[J]. 水产学报, 2007, 31(5): 655-660.
- [14] 孟勇, 吴光红, 朱晓华, 等. RP-HPLC 同时测定中华绒螯蟹肝脏中诺氟沙星、环丙沙星和恩诺沙星残留[J]. 中国水产科学, 2005, 12(6): 772-778.
- [15] 曲晓荣, 王印庚, 李胜忠, 等. 诺氟沙星在大菱鲆体内的药代动力学及残留消除规律[J]. 海洋水产研究, 2007, 28(5): 24-29.
- [16] 孙铭, 李健, 张喆, 等. 诺氟沙星 2 种给药方式在中国对虾体内的残留及消除规律[J]. 中国海洋大学学报, 2011, 41(5): 43-48.
- [17] 曾苏. 药物代谢学[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2004: 66-225.
- [18] Lin Y L, Dai Z K, Lin R J, et al. Baicalin, a flavonoid from *Scutellaria baicalensis* Georgi, activates large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels via cyclic nucleotide-dependent protein kinases in mesenteric artery [J]. Phytomedicine, 2010, 17(10): 760-770.
- [19] James M O. Catalytic properties of cytochrome P450 in hepatopancreas of the spiny lobster, *Panulirus argus*[J]. Marine Environmental Research, 1984, 14(1-4): 1-11.
- [20] 李小彦, 李健, 张喆, 等. 黄芩苷对中国对虾细胞色素 P450 酶及谷胱甘肽-S-转移酶活性的影响[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2010, 40(3): 49-53.
- [21] 韩华, 李健, 李吉涛, 等. 喹诺酮类药物对牙鲆肝药物代谢酶活性的影响[J]. 海洋科学, 2009, 33(11): 48-54.
- [22] 侯艳宁, 程桂芳, 朱秀媛. 黄芩苷对小鼠肝细胞色素 P450 的选择性诱导[J]. 药学学报, 2000, 35(12): 890-892.
- [23] 韩华, 李健, 李吉涛, 等. 黄芩苷对牙鲆肝 CYP1A 酶活性及基因表达的影响[J]. 中国水产科学, 2010, 17(5): 1121-1127.
- [24] 黄仁刚. 抗菌药物对肝药酶的抑制作用及其机理[J]. 国外医学抗生素分册, 1997, 18(6): 448-452.

Effects of baicalin on elimination of norfloxacin and activity of CYP450 enzymes in *Fenneropenaeus chinensis*

LI Jian¹, LIANG Jun-ping^{1,2}, LI Xiao-yan^{1,2}, LI Ji-tao¹, CHANG Zhi-qiang¹, DAI Fang-yu¹, ZHAO Fa-zhen^{1,2}

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2. College of Fisheries, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Received: Mar., 2, 2011

Key words: baicalin; norfloxacin; *Fenneropenaeus chinensis*; CYP450

Abstract: The *Fenneropenaeus chinensis* were divided into three groups fed with different experimental diets. The control group were fed with a non-medicated diet for fifteen days, single treatment group were fed with a non-medicated diet for ten days after a norfloxacin diet for five days, combined treatment group were fed baicalin diet for ten days after a norfloxacin diet for five days. Eight shrimps were randomly selected from the tank and sampled at different days after the first oral administration. Norfloxacin concentrations of hemolymph, hepatopancreas, gill and muscle were analyzed by HPLC and the activities of CYP1A (ECOD) and CYP2 (APND) was measured in hepatopancreas of *F. chinensis* by UV spectrophotometry and fluorospectrophotometry. The results showed that the $t_{1/2\beta}$ was significantly shorter in the combined treatment group than in the single treatment group, and the theoretical withdrawal period of combined treatment group reduced 23.92%, 22.73%, 25.92% and 21.92% compared with the single treatment group in hemolymph, hepatopancreas, gill and muscle. The activity of ECOD in the single treatment group was significantly lower than in the control group on the ninth, eleventh ($P<0.01$) and thirteenth days ($P<0.05$), while the activity of ECOD in the combined treatment group was only significantly lower than that in the control group on eleventh day ($P<0.05$), and it was significantly higher than control group on the fifteenth day ($P<0.01$); The activity of APND was significantly lower than the control group on the sixth and seventh days in the single treatment group and the combined treatment group ($P<0.05$), while it was significantly higher in the combined treatment group than the control group on the fifteenth day ($P<0.01$). Norfloxacin led to a very significant decrease of the activities of ECOD and APND compared to the control group, and the baicalin as an inducer could stimulate ECOD and APND to increase the enzyme activity in *F. chinensis*. When the norfloxacin and baicalin were administrated to farmed shrimps as medicated feed to treat bacterial infection, the inhibition of norfloxacin and the activation of baicalin could be considered to prevent a drug from affecting other drugs worse for *F. chinensis*, in order to keep the food safety for the people's health and the national economy.

(本文编辑: 谭雪静)