

# 恩诺沙星对脊尾白虾 APND、ECOD 和 GST 活性的影响

翟倩倩<sup>1,2</sup>, 李 健<sup>1,2</sup>

(1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266200)

**摘要:** 为研究脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)药物代谢酶对恩诺沙星的响应及其在恩诺沙星代谢过程中的作用, 作者以 10、20 和 40 mg/kg 恩诺沙星连续投喂脊尾白虾 3 d, 于投喂后的第 1、2 天以及停止投喂药物的第 1、4、8、12、24、48、72、120 小时取样, 测定了脊尾白虾肝胰腺、鳃和血清中的氨基比林-N-脱甲基酶(aminopyrine-N-demethylase, APND)、7-乙氧基香豆素-O-脱乙基酶(7-ethoxycoumarin-O-Deethylase, ECOD)和谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione-S-transferase, GST)的活性。结果表明: 不同浓度恩诺沙星对脊尾白虾肝胰腺、鳃和血清中 I 相药物代谢酶 APND 和 ECOD 活性均呈现显著抑制作用( $P<0.05$ )。投喂药物后, APND 和 ECOD 活性呈现先下降后逐渐上升趋势, 3 个剂量组酶活性均在最后一次给药后 8 h 达到最低。与对照组相比, 不同浓度恩诺沙星对各组织中 II 相药物代谢酶 GST 活性呈现显著诱导作用( $P<0.05$ ), 此作用呈现先上升后下降的趋势。恩诺沙星对脊尾白虾 APND、ECOD 及 GST 活性的作用均呈现剂量依赖性。本研究表明, 脊尾白虾 I 相和 II 相代谢酶均会对药物做出反应, 可作为其养殖过程中药物代谢及适用性的指示物。

**关键词:** 脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*); 恩诺沙星; 氨基比林-N-脱甲基酶(APND); 7-乙氧基香豆素-O-脱乙基酶(ECOD); 谷胱甘肽-S-转移酶(GST)

中图分类号: S948; S913 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2017)02-0053-08

DOI: 10.11759//hykx20160113004

脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)是中国重要的经济虾类之一, 因其繁殖能力强、生长速度快、环境适应性广, 被广泛用于池塘单养、虾蟹混养和虾池秋冬季养殖, 已成为中国江苏、浙江、山东等沿海滩涂地区主要的特色水产养殖品种<sup>[1-3]</sup>。但近年来伴随着虾类养殖产业高密度生产的集约化, 脊尾白虾养殖不断受到病害频发的困扰, 药物使用仍然是目前水产养殖中病害防治的主要手段<sup>[4-5]</sup>。恩诺沙星(Enrofloxacin)为第 3 代喹诺酮类动物专用抗菌药物, 因其抗菌谱广、疗效显著等特点, 被广泛应用于兽医临床, 在中国经济鱼虾类病害防治过程中发挥积极作用<sup>[6-8]</sup>。但此药物在食品动物中的残留会引起部分人群产生过敏反应、恶心、腹泻、软骨损伤等损害, 甚至导致耐药性的产生<sup>[9]</sup>, 因而其在可食性动物组织中的代谢和残留已经引起广泛关注。

药物在生物体内的代谢转化主要是通过药物代谢酶起作用, 细胞色素 P450(cytochrome P450, CYP450)和谷胱甘肽-S-转移酶(gultathione-S-transferases, GST)是药物转化过程中的两个重要代谢酶系<sup>[10-11]</sup>。CYP450 酶作为药物代谢 相酶能对药物分子进行

官能团化反应, 使药物发生氧化、还原或水解作用。GST(gultathione-S- transferases, GST)是药物代谢相反应中一类重要的药物代谢转移酶, 可催化谷胱甘肽(GSH)等内源性物质与 相代谢产物结合, 使药物排出体外<sup>[12]</sup>, 在解毒系统中起重要作用。以往研究表明, 海洋动物体内的 CYP450 和 GST 活性可以受到多种外源物质的影响, 包括药物、金属离子、原油、有机物等<sup>[13-15]</sup>。

收稿日期: 2016-01-13; 修回日期: 2016-07-20

基金项目: 山东省自然科学基金项目(BS2015HZ015); 国家虾现代产业技术体系项目(CARS-47); 山东泰山产业领军人才工程项目(LJNY2015002); 青岛海洋科学与技术国家实验室鳌山科技创新计划项目(2015ASKJ02)

[Foundation: Natural Science Foundation of Shandong Province, No.BS2015HZ015; Modern Agro-industry Technology Research System, No.CARS-47; the Program of Shandong Leading Talent No.LJNY2015002; Ao Shan Scientific and Technological Innovation Project Financially Supported by Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, No.2015ASKJ02]

作者简介: 翟倩倩(1984-), 女, 山东泰安人, 助理研究员, 博士, 主要从事水产药理学及水产品质量安全研究, 电话: 0532-85826690, E-mail: zqq0817@163.com; 李健, 通信作者, 研究员, 电话: 0532-85830183, E-mail: lijian@ysfri.ac.cn

药物代谢酶活性的诱导或抑制可改变药物的代谢,并影响药效和毒性。许多药动学特征(药物半衰期、药物间相互作用、清除率、生物利用度及药物残留等)均与药物代谢酶有关<sup>[16]</sup>。研究药物对药物代谢酶的作用,对于保证临床合理给药、避免药物不良反应以及控制药物残留都具有重要价值。但同一种外源物质对不同物种药物代谢酶的作用并不完全一致<sup>[17]</sup>。国内外学者围绕药物对水产养殖动物药物代谢酶的影响进行了多项相关研究,涉及的药物包括氟苯尼考<sup>[18]</sup>、呋喃西林<sup>[19]</sup>、黄芩苷<sup>[20]</sup>、磺胺二甲嘧啶<sup>[21]</sup>等,研究物种包括凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)<sup>[18]</sup>、中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)<sup>[19-20]</sup>、大菱鲆(*Turbot*)<sup>[21]</sup>、鲫鱼(*Crucian carp*)<sup>[22]</sup>等。但目前尚未有恩诺沙星对脊尾白虾药物代谢酶活性影响的报道。

本研究采用药饵给药的方法,研究了不同剂量恩诺沙星对脊尾白虾相酶氨基比林-N-脱甲基酶(aminopyrine-N-demethylase, APND)、7-乙氧基香豆素-O-脱乙基酶(7-ethoxycoumarin-O-Deethylase, ECOD)及相酶谷胱甘肽-S-转移酶活性的影响,以期探讨上述酶类对恩诺沙星的响应及其在脊尾白虾体内恩诺沙星代谢过程中的作用。这对于脊尾白虾养殖中恩诺沙星的合理使用、科学联合用药及控制药物残留都具有重要意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料与主要试剂

实验动物为健康脊尾白虾,购于昌邑市海丰水产养殖责任有限公司,平均体长 4.07 cm±0.45 cm,体质量 1.12 g±0.21 g,于 PVC 桶(200 L)中暂养 1 周,每桶 50 尾。实验期间,水温(22±2)℃,盐度 23±1, pH 8.0±0.3,不间断充气,每天换水 1/3,并投喂不含药物的虾基础饵料。

恩诺沙星(含量 98%)购自德邦制药公司。

### 1.2 实验设计

实验设 1 个对照组和 3 个实验组(高、中、低剂量组),每组 50 尾虾。对照组投喂不含药物的基础饵料,药物组投喂自制药饵。基础饵料配方如下:鱼粉(46%)、花生粉(25%)、豆粕(10%)、面粉(7%)、鱼油(5%)、玉米粉(5%)、鱼膏(2%)。含药饵料采用鸡蛋作为黏合剂,按照每天每千克虾体质量摄食量 20 g 计算,结合药效学实验和药典推荐剂量,将恩诺沙

星药粉分别按照 10 mg/kg(低剂量组)、20 mg/kg(中剂量组)和 40 mg/kg(高剂量组)的给药剂量添加制得,饲料直径约 2 mm。

投饵及样品采集:实验前一天停止投喂基础饵料,实验开始后,实验组分别投喂含不同剂量恩诺沙星的含药饵料,每天早晚各投喂 1 次,连续投喂 3 d 含药饵料后改喂基础饵料,对照组以同样方式投喂不含药物的基础饵料。分别于给药期间的 1、2 d(24、48 h)及最后一次给药后的 1、4、8、12、24、48、72、120 h(1、4、8、12、24、48、72、120 hP)用一次性注射器于脊尾白虾第一腹节处抽取血淋巴,4℃静置 2 h 后 5 000 r/min 离心 10 min,取上层血清保存至-70℃冰箱直至分析,肝胰腺和鳃组织样品取出后也于-70℃保存直至分析。

### 1.3 样品制备

S9 微粒体制备:肝胰腺和鳃 S9 微粒体的制备参照沈钧<sup>[23]</sup>等改进的方法进行,用预冷的 PBS 缓冲液反复冲洗肝胰腺和鳃组织 3 次,除去表面血污,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 pH 7.5 PBS,含 1 mmol/L EDTA-2Na, 1 mmol/L PMSF, 1 mmol/L PTU, 0.1 mmol/L DTT, 15%甘油),将肝胰腺和鳃转入 Precellys 24 dual 多功能样品均质器匀浆,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。制备好的 S9 微粒体用于测定其中代谢酶的活性。

### 1.4 S9 蛋白含量测定

牛血清白蛋白标准曲线的制备:在试管中分别加入 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL BSA 母液(1 g/L),补充双蒸水至 1 mL,参照 Bradford 方法测定蛋白含量,以系列浓度的牛血清白蛋白为横坐标, A 值为纵坐标,得出牛血清白蛋白标准曲线回归方程。

S9 蛋白浓度测定:将待测样本稀释 20 倍,取稀释后样本 0.1 mL,其余步骤参照标准曲线制作方法,根据线性回归方程计算 S9 样品蛋白含量,以便于计算单位蛋白中的酶活性。

### 1.5 药物代谢酶活性测定

#### 1.5.1 氨基比林-N-脱甲基酶(APND)活性测定

APND 活性的测定参照文献<sup>[24]</sup>的方法并适当修改,取 0.1 mol/L PBS(pH=7.4)缓冲液 1.7 mL,加 S9 蛋白悬液 0.1 mL,氨基比林(24 g/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 15%ZnSO<sub>4</sub> 0.35 mL, 混匀, 冰浴 5 min, 加饱和 Ba(OH)<sub>2</sub> 0.35 mL, 混匀, 室温放置 5 min 后 5 000 r/min 离心 10 min。取上清 2 mL, 加 Nash 试剂 2 mL, 60℃水浴 10 min, 自来水冷却, 紫外可见分光光度计于 420 nm 测定吸光值。

### 1.5.2 7-乙氧基香豆素-O-脱乙酰酶(ECOD)活性测定

ECOD 活性的测定参照文献[25]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 mmol/L 7-乙氧基香豆素)140 μL, 加入 S9 悬液 10 μL, 27℃孵育 5 min, 测定管加 10 mmol/L NADPH 10 μL, 空白管加相应体积缓冲液, 37℃水浴 10 min  $E_x=380$ ,  $E_m=460$  条件下测定其产物 7-羟基香豆素浓度。

### 1.5.3 谷胱甘肽-S-转移酶(GST)活性测定

参照谷胱甘肽-S-转移酶测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)说明书。

## 1.6 数据处理

实验数据以平均值±标准差( $\bar{x} \pm SD$ )表示, 采用 SPSS 19.0 软件, 用 Duncan's 法对均值进行多重比较,  $P < 0.05$  为具有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 恩诺沙星对脊尾白虾 I 相代谢酶活性的影响

#### 2.1.1 氨基比林-N-脱甲基酶(APND)活性

如图 1 所示, 恩诺沙星对脊尾白虾肝胰腺、鳃和血清 APND 活性均呈现抑制作用, 且该抑制作用存在一定的时间和剂量效应。随恩诺沙星浓度的升高, 肝胰腺、鳃和血清中 APND 活性受到的抑制作用愈加明显, 且 3 组织中 APND 活性均呈现先降低后上升的趋势。低剂量组肝胰腺中 APND 活性在末次给药后的 4~48 h 与对照组有显著性差异( $P < 0.05$ ), 中剂量组在末次给药后的 1~72 h 与对照组有显著性差异( $P < 0.05$ ), 高剂量组除末次给药后的 120 h 外, 其余时间点肝胰腺 APND 活性均与对照组有显著性差异( $P < 0.05$ )。其中末次给药后的 8 h 3 个剂量组的肝胰腺 APND 活性最低, 高、中、低剂量组 APND 的活性分别为对照组的 11.87%、14.73%、17.87%。给予恩诺沙星药饵后, 3 个剂量组的脊尾白虾鳃和血清中的 APND 活性均在末次给药后的 8 h 时达到最低,

其中鳃组织中高、中、低剂量组的 APND 活性分别为 2.71、3.48、4.02 nmol/(min·mg), 为对照组的 26.57%、34.12%、39.41%。血清中高、中、低剂量组 APND 活性分别为 0.87、1.16、1.62 nmol/(min·mg), 为对照组的 13.81%、18.41%、25.72%。

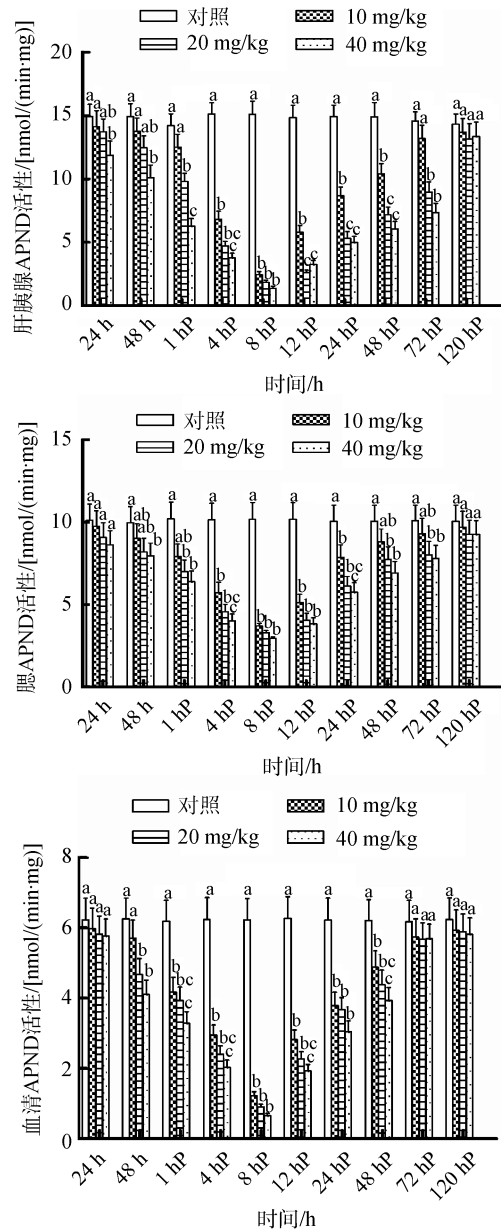


图 1 不同浓度恩诺沙星对脊尾白虾肝胰腺、鳃、血清 APND 活性的影响

Fig. 1 Effects of enrofloxacin on the activities of APND in hepatopancreas, gills, and serum

标有不同字母者表示在同一时间点组间差异显著( $P < 0.05$ ), h 指给药期间的取样点, hp 为最后一次给药结束后的取样点。图 2、图 3 同  
The different letters indicate significant differences between the groups at the same time point ( $P < 0.05$ ), h refers to the sampling point during administration, hp is the sampling point after the end of the administration. the same as Fig.2, Fig.3

### 2.1.2 7-乙氧基香豆素-O-脱乙酰酶(ECOD)活性

由图 2 可知, 各剂量组恩诺沙星对脊尾白虾肝胰腺、鳃和血清 ECOD 活性均呈现抑制作用。3 个组织中 ECOD 活性均在末次给药后的 8 h 达到最低, 随后逐渐恢复至对照组水平。末次给药 8 h 后, 肝胰腺中高、中、低剂量组的 ECOD 活性分别为对照组的 44.47%、55.26%、60.53%, 鳃组织中为 56.16%、

60.27%、63.01%, 血清中为 55.56%、66.67%、77.78%。不同的是, 血清中 ECOD 的抑制效应较肝胰腺和鳃组织出现和消失得更快, 血清中 ECOD 活性在给药第 2 天即出现抑制作用, 而肝胰腺和鳃组织在末次给药后的 1 h 才出现抑制作用; 3 个剂量组的血清 ECOD 活性在末次给药后的 72 h 均恢复至对照组水平, 而 3 个剂量组的肝胰腺和鳃组织 ECOD 活性在末次给药后的 120 h 才均恢复至对照组水平。恩诺沙星对脊尾白虾肝胰腺、鳃和血清 ECOD 活性的抑制存在剂量依赖性, 抑制率整体呈现为高剂量组>中剂量组>低剂量组。

### 2.2 恩诺沙星对脊尾白虾 II 相酶谷胱甘肽-S-转移酶(GST)活性的影响

如图 3 所示, 脊尾白虾连续投喂恩诺沙星饵料后, 肝胰腺、鳃和血清中 GST 均被诱导, 活性呈先上升后降低的趋势。肝胰腺中 GST 活性在 8 hP 达到最高, 低、中、高 3 个剂量组 GST 活性分别是 187.23、240.78、278.41 U/mg 蛋白, 为对照组的 2.64、3.06 和 3.59 倍, 低剂量组在末次给药后 48 h 恢复至对照组水平, 中、高剂量组在末次给药后 72 h 恢复至对照组水平( $P>0.05$ ); 鳃中 GST 活性也在 8 hP 达到最高, 低、中、高 3 个剂量组 GST 活性分别是 99.12、135.26、152.64 U/mg, 为对照组的 1.71、2.33 和 2.62 倍, 低、中剂量组在 48 hP 恢复至对照组水平, 高剂量组在 72 hP 恢复至对照组水平( $P>0.05$ ); 与肝胰腺和鳃不同, 恩诺沙星对血清中 GST 的诱导效应较肝胰腺和鳃中出现和消失都更早, 3 剂量组的 GST 活性均在 4 hP 达到最高, 低、中、高剂量组分别对照组的 1.55、1.89、2.39 倍, 低、中剂量组 GST 活性在 12 hP 恢复至对照组水平, 高剂量组在 24 hP 恢复至对照组水平( $P>0.05$ )。

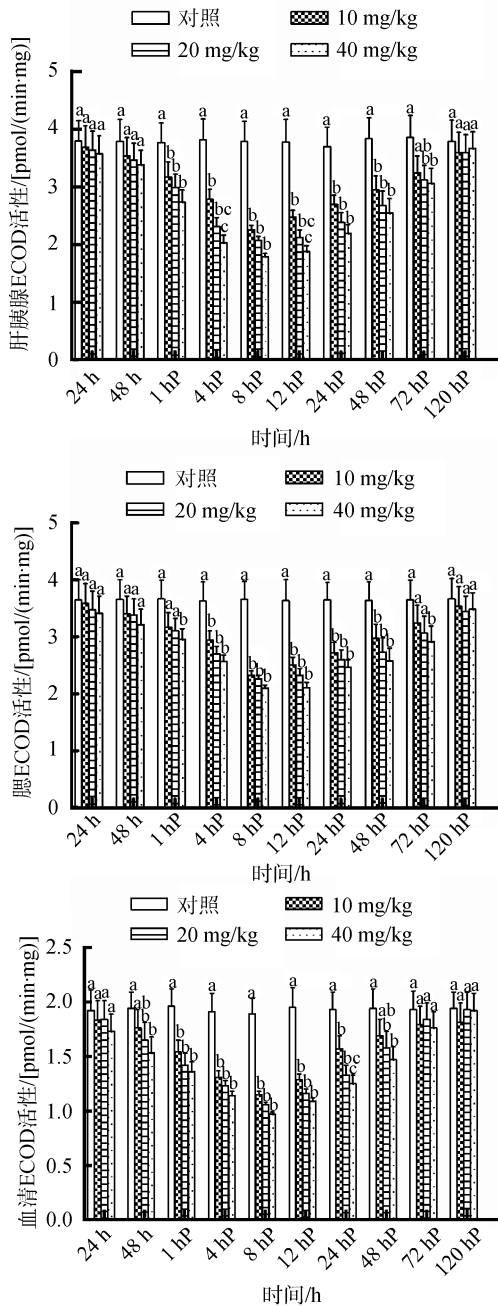


图 2 不同浓度恩诺沙星对脊尾白虾肝胰腺、鳃、血清 ECOD 活性的影响  
Fig. 2 Effects of enrofloxacin on the activities of ECOD in hepatopancreas, gills, and serum

### 3 讨论

APND 和 ECOD 分别是 CYP450 家族中 CYP2B 和 CYP1A 活性的标志酶, 是生物体内参与外源污染物 相反代谢过程中重要的两个解毒酶。CYP2B 主要代谢各种亲脂性药物和固醇类药物<sup>[22, 26]</sup>, 使其转化为易于排泄的代谢产物, 从而起到解毒作用; CYP1A 是一种芳香基碳氢化合物氢化酶, 目前已成为评价环境污染状况的最灵敏的生物标志物之一, 广泛应用于毒理学研究<sup>[27]</sup>。本实验中, 不同浓度的恩诺沙星连续作用于脊尾白虾后, 随着作用时间的延

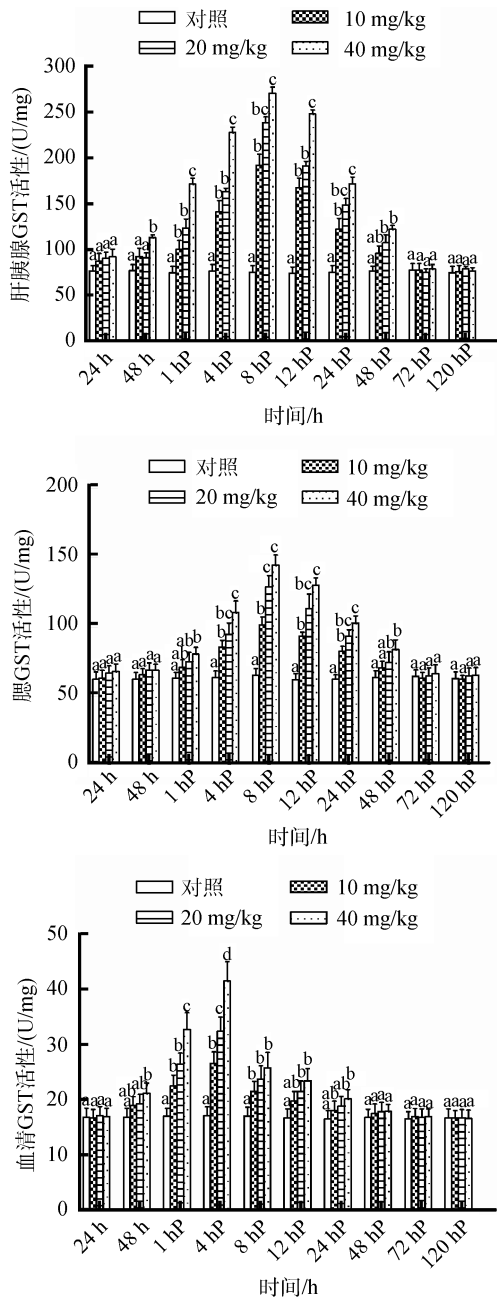


图3 不同浓度恩诺沙星对脊尾白虾肝胰腺、鳃、血清 GST 活性的影响

Fig. 3 Effects of enrofloxacin on the activities of GST in hepatopancreas, gills, and serum

长, 其肝胰腺中 APND 和 ECOD 活性均逐渐被抑制, 呈现先下降后上升的趋势, 且该抑制作用存在一定的时间和剂量效应, 这与文献报道喹诺酮类药物对 CYP450 代谢酶的主要表现为抑制作用一致。张喆等<sup>[28]</sup>的研究显示, 诺氟沙星对中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 鳃和血清的 APND 具有抑制作用, 酶活性先下降后上升。Vaccaro 等<sup>[29]</sup>研究表

明恩诺沙星对舌齿鲈 (*Dicentrarchus labrax*) 红霉素-N-脱甲基酶 (ERND) 活性具有抑制作用。韩华等<sup>[30]</sup>探讨了喹诺酮类药物对牙鲈肝脏 CYP450 酶活性的影响, 结果表明诺氟沙星对 APND 和 ERND 酶活性均具有显著性抑制作用 ( $P < 0.01$ )。关于恩诺沙星等喹诺酮类药物对 CYP450 的抑制机制, Fuhr 等学者<sup>[31]</sup>认为与喹诺酮类药物的分子组成及空间构象有关, 喹诺酮类药物分子中 8 位上没有取代基或 7 位哌嗪基 3' 和 4' 上无甲基等取代基, 使其对 CYP450 酶具有较强的抑制作用。CYP450 酶活性的抑制作用可通过多种途径实现, 如抑制蛋白的合成、降低细胞色素 P450 含量、影响药物氧化过程中电子传递及辅酶的合成等<sup>[32]</sup>。除肝胰腺外, 恩诺沙星对脊尾白虾鳃中的 APND、ECOD 酶活性也具有较强的抑制作用, 说明脊尾白虾鳃丝也存在丰富的 CYP450 酶, 在代谢外源物质的过程中也起着重要的作用。虽然甲壳动物的肝胰腺被公认为是 CYP450 依赖的转化外源物质的主要器官, 但是其他组织包括鳃、胃、肠和触角腺均被证明具有 CYP450 活力, 在部分外源物质及生理上重要的内源物质的代谢过程中也具有举足轻重的地位<sup>[33]</sup>。此外, 恩诺沙星对血清 APND、ECOD 活性抑制作用的出现和消失均早于肝胰腺和鳃组织, 可能与甲壳类的开放式循环系统有关。

GST 是药物代谢 相反应中一类重要的药物代谢转移酶, 可催化许多内外源性物质的亲电基团与还原型谷胱甘肽的巯基结合, 增加其疏水性使其易于穿越细胞膜排出体外, 具有消除体内自由基和解毒的双重功能<sup>[34]</sup>。文献报道显示许多外源物质可对 GST 活性产生诱导作用。聂湘平等<sup>[35-36]</sup>研究发现环丙沙星可以分别显著诱导异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 和剑尾鱼 (*Xiphophorus helleri*) GST 活性。吴伟等<sup>[37]</sup>以不同浓度的溴氟菊酯处理罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 25 d, 发现体内 GST 的活性先被显著诱导升高, 后又降低。这可能是由于随着暴露时间的延长, 鱼体内积累了较多的氧化产物如丙二醛的含量增加, 导致体内 GST 酶活性受到抑制, 甚至蛋白质受到较大程度的损伤。本研究中, 恩诺沙星对脊尾白虾 GST 活性的影响与上述物质相一致。恩诺沙星对脊尾白虾 GST 活性具有诱导作用, 在恩诺沙星作用下, 脊尾白虾体内 GST 活性呈现先上升后下降的趋势。连续投喂恩诺沙星饵料后, 脊尾白虾血清、肝胰腺和鳃组织中 GST 活性分别在 4 和 8 hP 达到最大值, 在 48 和 72 hP 时, 血清、肝胰腺和鳃中 GST 活性又降低

到与对照组相当。这是由于最初暴露时, GST 活性增加, 以降低暴露物对机体产生的危害。随着暴露时间的延长, 虾体内暴露物超出了 GST 的承载力, 丙二醛含量逐渐升高, 肝胰腺逐渐受到损伤所致。丙二醛是细胞氧化代谢产物, 其含量高低反应了机体细胞受到自由基攻击的程度<sup>[38]</sup>。本实验肝胰腺对照组的 GST 活性远大于鳃丝, 药物组诱导程度较高, 说明脊尾白虾 GST 解毒途径主要经肝胰腺进行, 反映了肝胰腺在药物解毒过程中的重要地位, 而鳃为虾类的呼吸器官, 通过体内代谢吸收及体外直接接触, 鳃中 GST 对药物进行解毒诱导其活性升高。

本研究结果表明, 机体对恩诺沙星的代谢, 一方面通过抑制 相代谢酶的活性, 抑制药物的活化, 另一方面通过诱导 相代谢酶的活性, 加速药物的解毒与代谢。在实际生产中, 当恩诺沙星与其他药物合并用药时, 要注意药物合理配伍, 避免药效学的改变或药物蓄积出现不良反应。因此, 可将 相和相酶活性变化作为脊尾白虾养殖过程所用药物代谢及适用性的指示物。

#### 参考文献:

- [1] Xu W J, Xie J J, Shi H, et al. Hematodinium infections incultured ridgetail white prawns, *Exopalaemon carinicauda*, in eastern China[J]. *Aquaculture*, 2010, 300(1-4): 25-31.
- [2] Li J T, Han J Y, Chen P, et al. Cloning of a heat shock protein 90 (HSP90) gene and expression analysis in the ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 32(6): 1191-1197.
- [3] Duan Y F, Liu P, Li J T, et al. cDNA cloning, characterization and expression analysis of peroxiredoxin 5 gene in the ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda*[J]. *Molecular Biology Reports*, 2013, 40(21): 6569-6565.
- [4] 刘俊强. 水产动物疾病学发展及水产动物疾病的综合防治[J]. *兽医导刊*, 2015, 10: 24.  
Liu Junqiang. Disease development of aquatic animals and comprehensive prevention and control of aquatic animal diseases[J]. *Animal Health*, 2015, 10: 24.
- [5] 胡晓刚. 我国水产养殖动物病害的现状与发展方向[J]. *福建农业*, 2015, 3: 108.  
Hu Xiaogang. Present situation and development direction of animal diseases in aquaculture in China[J]. *Fujian Agriculture*, 2015, 3: 108.
- [6] 徐东峰. 恩诺沙星的作用机理与妙用[J]. *湖北畜牧兽医*, 2000, 5: 31-32.  
Xu Dongfeng. Mechanism and application of enrofloxacin[J]. *Hubei Province Animal Husbandry and Veterinary*, 2000, 5: 31-32.
- [7] Intorre L, Cecchini S, Bertini S. Pharmacokinetics of enrofloxacin in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*)[J]. *Aquaculture*, 2000, 182: 49-59.
- [8] 唐一鸣, 姜中其, 方兰勇, 等. 乳酸恩诺沙星对实验性鸡大肠杆菌病及沙门氏菌病的药效[J]. *浙江农业科学*, 2010, 5: 1110-1113.  
Tang Yiming, Jiang Zhongqi, Fang Lanyong, et al. Efficacy of enrofloxacin lactate on experimental chicken *E.coli* and *Salmonellosis*[J]. *Journal of Zhejiang Agricultural Sciences*, 2010, 5: 1110-1113.
- [9] 仲兆金. 喹诺酮类药物的毒性[J]. *国外医药(抗生素分册)*, 2001, 22(1): 31-33.  
Zhong Zhaojin. Toxicity of Quinolones[J]. *Foreign Medicine (archives of antibiotics)*, 2001, 22(1): 31-33.
- [10] 李小彦, 李健, 张喆, 等. 黄芩苷对中国明对虾细胞色素 P450 酶系及谷胱甘肽-S-转移酶活性的影响[J]. *中国海洋大学学报*, 2010, 40(3): 49-53.  
Li Xiaoyan, Li Jian, Zhang Zhe, et al. Effects of baicalin on cytochrome P450 enzymes and glutathione S-transferase of *Fenneropenaeus Chinensis*[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2010, 40(3): 49-53.
- [11] Slaughter R L, Edwards D J. Recent advances: the cytochrome 450 enzymes[J]. *Annals of Pharmacotherapy*, 1995, 29(6): 619-624.
- [12] 任加云, 李树峰. 多氯联苯(PCB<sub>1254</sub>)对栉孔扇贝消化盲囊和腮丝 EROD、GST 酶活力的影响[J]. *中国水产科学*, 2008, 15(2): 342-346.  
Ren Jiayun, Li Shufeng. Effects of polychlorinated biphenyls 1254 (PCB<sub>1254</sub>) on two enzyme activity of biotransformation in digestive gland and gills of scallop *Chlamys ferrari*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2008, 15(2): 342-346.
- [13] Henczová M, Deér A K, Filla A, et al. Effects of Cu<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup> on different fish species: liver cytochrome P450-dependent monooxygenase activities and FTIR spectra[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology C-toxicology & Pharmacology*, 2008, 148(1): 53-60.
- [14] Georgiades E T, Danis B, Gillan D C, et al. Effect of crude oil contaminated sediment exposure on cytochrome P450 enzymes in the Australian asteroid *Coscinasterias muricata*[J]. *Chemosphere*, 2006, 65(10): 1869-1877.
- [15] Monari M, Cattani O, Serrazanetti G P. Effect of exposure to benzo[a]pyrene on SODs, CYP1A1/1A2- and CYP2E1 immunopositive proteins in the blood clam *Scapharca inaequivalvis*[J]. *Marine Environmental Research*, 2007, 63(3): 200-218.
- [16] 吴永章, 刘力, 杨志强, 等. 细胞色素 P450 与兽药

- 的研发应用[J]. 中国兽药杂志, 2007, 41(1): 46-48.  
Wu Yongzhang, Liu Li, Yang Zhiqiang, et al. The relationship between cytochrome P450 and the development and application of veterinary drugs[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2007, 41(1): 46-48.
- [17] Koenig S, Fernández P, Solé M. Differences in cytochrome P450 enzyme activities between fish and crustacea: relationship with the bioaccumulation pattern of polychlorobiphenyls (PCBs)[J]. Aquatic Toxicology, 2012, 108: 11-17.
- [18] Ren X Y, Pan L Q, Wang L. Tissue distribution, elimination of florfenicol and its effect on metabolic enzymes and related genes expression in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* following oral administration[J]. Aquaculture Research, 2016, 47: 1584-1595.
- [19] 李东利, 李健, 常志强, 等. 呋喃西林代谢物在中国对虾体内残留消除规律及其对代谢酶活性的影响[J]. 渔业科学进展, 2015, 36(5): 87-94.  
Li Dongli, Li Jian, Chang Zhiqiang, et al. The elimination rules of nitrofurazone metabolites and its effects on activities of metabolic enzymes in *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2015, 36(5): 87-94.
- [20] 李健, 梁俊平, 李小彦, 等. 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[J]. 海洋科学, 2012, 36(3): 81-88.  
Li Jian, Liang Junping, Li Xiaoyan, et al. Effects of baicalin on elimination of norfloxacin and activity of CYP450 enzymes in *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Marine Sciences, 2012, 36(3): 81-88.
- [21] 孙爱荣. 噁喹酸、环丙沙星和磺胺二甲嘧啶在大菱鲆体内的药代动力学及其代谢酶基因 CYP3A 的克隆与表达分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2012.  
Sun Airong. Pharmacokinetics of oxolinic acid, ciprofloxacin, sulfamethazine in turbot and molecular cloning and expression analysis of its cytochrome P450 3A gene[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2012.
- [22] 陈大健. 鲫鱼肝微粒体细胞色素 P450 酶系的初步研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2006.  
Chen Dajian. A Preliminary study on hepatic microsomal cytochrome P450 in *Carassius auratus*[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2006.
- [23] 沈钧, 徐佩佩. 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.  
Shen Jun, Xu Peipei. The improvement of determination method of cytochrome P450 in liver[J]. Industrial Health and Occupational Diseases, 1997, 23(4): 236-238.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] Waxman D J, Azaroff L. Phenobarbital induction of cytochrome-450 gene expression[J]. Biochemical Journal, 1992, 281(3): 577-592.
- [27] 刘移民, 王翔朴. 细胞色素氧化酶 P450 研究新进展[J]. 卫生毒理学杂志, 2000, 14(4): 243-246.  
Liu Yimin, Wang Xiangpu. New progress of cytochrome oxidase P450 research[J]. Journal of Health Toxicology, 2000, 14(4): 243-246.
- [28] 张喆, 李健, 陈萍, 等. 诺氟沙星对中国明对虾鳃和血清 ECOD、APND 和 GST 活性的影响. 中国水产科学, 2012, 19(3): 514-520.  
Zhang Zhe, Li Jian, Chen Ping, et al. Effects of norfloxacin on gill and serum ECOD, APND, and GST activity in *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(3): 514-520.
- [29] Vaccaro E, Giorgi M, Longo V, et al. Inhibition of cytochrome p450 enzymes by enrofloxacin in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*)[J]. Aquatic Toxicology, 2003, 62(1): 27-33.
- [30] 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.  
Han Hua, Li Jian, Li Jitao, et al. Effects of quinolones on activity of hepatic drug-metabolizing enzymes in *Paralichthys olivaceus*[J]. Marine Sciences, 2009, 33(11): 48-54.
- [31] Fuhr U, Strobl G, Manant F, et al. Quinolone antibacterial agents: relationship between structure and in vitro inhibition of the human cytochrome P450 isoform CYP1A2[J]. Molecular Pharmacology, 1993, 43(2): 191-199.
- [32] Lesca P, Lecoite C, Paoletti C, et al. Induction of rat hepatic mono-oxygenases by ellipticine: formation of cytochrome p448. Hydroxylating activity[J]. Comptes Rendus Hebdomadaires des séances del'Académie des Sciences. Série D: Sciences Naturelles, 1976, 282(15): 1457-1460.
- [33] Margaret O J, Sean M B. Cytochromes P450 in crustacean[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 1998, 121 (1-3): 157-172.
- [34] Reinemer P, Prade L, Hof P, et al. Three-dimensional structure from *Arabidopsis thaliana* at 2.2 Å Resolution: structural characterization of herbicide-conjugating plant glutathione S-transferase and a novel active site architecture[J]. Journal of Molecule Biology, 1996,

- 255(2): 289-309.
- [35] 聂湘平, 陈菊芳, 王翔, 等. 环丙沙星在异育银鲫 (*Allogy nogenetic crucian*)体内的积累分布及其毒性效应[J]. 生态学报, 2008, 28(1): 246-252.  
Nie Xiangping, Chen Jufang, Wang Xiang, et al. Accumulation, distribution and its toxic effects of ciprofloxacin in *Allogy crucian carp*[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2008, 28(1): 246-252.
- [36] 聂湘平, 王翔, 李凯彬. 抗生素药物环丙沙星对剑尾鱼的毒性效应[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2007, 46(5): 70-73.  
Nie Xiangping, Wang Xiang, Li Kaibin. Toxicity effects of ciprofloxacin hydrochloride to swordtail fish (*Xiphophorus helleri*) [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatsni*, 2007, 46(5): 70-73.
- [37] 吴伟, 陈家长, 冷春梅, 等. 溴氰菊酯对罗非鱼谷胱甘肽及 S 转移酶的影响[J]. 中国环境科学, 2006, 26(4): 474-477.  
Wu Wei, Chen Jiazhang, Leng Chunmei, et al. The effect of deltamethrin on glutathione and glutathione-S-transferase in the body of tilapia[J]. *China Environmental Science*, 2006, 26(4): 474-477.
- [38] 何秀婷, 程章, 聂湘平, 等. 诺氟沙星对阿部鲮虾鳃相、相酶活性及 CYP1A1 和 P-gp mRNA 表达影响[J]. 环境科学学报, 2011, 31(4): 846-853.  
He Xiuting, Cheng Zhang, Nie Xiangping, et al. Effects of norfloxacin on the phase and enzyme activities and mRNA expressions of CYP1A1 and P-gp of *Mugilogobius abei*[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2011, 31(4): 846-853.

## Effects of enrofloxacin on APND, ECOD and GST activities in *Exopalaemon carinicauda*

ZHAI Qian-qian<sup>1, 2</sup>, LI Jian<sup>1, 2</sup>

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Function Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266200, China)

Received: Jan. 13, 2016

**Key words:** *Exopalaemon carinicauda*; enrofloxacin; aminopyrine-N-demethylase (APND); 7-ethoxycoumarin-O-deethylase (ECOD); glutathione-S-transferase (GST)

**Abstract:** To study the response of drug metabolism enzymes to enrofloxacin and their function in the metabolism of enrofloxacin, shrimp (*Exopalaemon carinicauda*) were fed with medicated feed at doses of 10, 20, and 40 mg/(kg·BW) daily, and shrimp in each group were sampled on day 1 and day 2 during the drug exposure period and 1, 4, 8, 12, 24, 48, 72, and 120 h after the end of the drug exposure period. Levels of aminopyrine-N-demethylase (APND), 7-ethoxycoumarin-O-deethylase (ECOD), and glutathione-S-transferase (GST) were determined in the hepatopancreas, gills, and serum. Results showed that different concentrations of enrofloxacin could significantly inhibit the activities of phase I metabolism enzymes APND and ECOD in the hepatopancreas, gills, and serum ( $P < 0.05$ ). After feeding with the drug, the activities of APND and ECOD first decreased and then increased gradually. Activities of the metabolism enzymes in the three concentration groups were lowest at 8 h after dosing. Compared with the control group, different concentrations of enrofloxacin significantly induced the activities of phase II metabolism enzyme GST in the three tissues ( $P < 0.05$ ), and the induction of the activities were first increased and then decreased gradually. The effects of enrofloxacin on the activities of APND, ECOD, and GST were all dose dependent. In conclusion, this study demonstrated that phase I and phase II enzymes of *E. carinicauda* are sensitive parameters that could be used as biomarkers for evaluating the exposure to aquatic drugs.

(本文编辑: 谭雪静)