

恩诺沙星对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) *CYP2* 基因表达及氨基比林-N-脱甲基酶 活性的影响*

王 莹^{1,2} 李 健^{2,3①} 葛倩倩² 翟倩倩² 李东利² 葛红星²

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;
3. 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 青岛 266237)

摘要 以凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)为研究对象,运用 RT-PCR 方法测定 *CYP2* 基因在凡纳滨对虾组织中的表达分布,并分析不同剂量恩诺沙星对凡纳滨对虾肝胰腺中 *CYP2* 基因表达和氨基比林-N-脱甲基酶(APND)活性的影响。结果显示, *CYP2* 在肝胰腺、鳃、血淋巴、肌肉、甲壳、肠、胃、心脏和眼柄中均有分布,在肝胰腺中表达量最高,胃次之,血淋巴中表达量最低。口服低(15 mg/kg)、中(30 mg/kg)、高(60 mg/kg) 3 个剂量恩诺沙星药饵后,凡纳滨对虾肝胰腺中 *CYP2* 基因表达和 APND 活性较对照组均呈现下降趋势;药物浓度越高,基因表达量和酶活性越低,表明恩诺沙星可抑制 *CYP2* 在凡纳滨对虾体内的表达。在生产实践中联合用药时,应考虑到因恩诺沙星对 *CYP2* 的抑制作用而导致经其代谢的药物在生物体内的蓄积和毒性增强。

关键词 凡纳滨对虾; *CYP2*; 组织分布; 恩诺沙星; APND 活性

中图分类号 S912 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)02-0099-06

细胞色素 CYP450 (Cytochrome CYP450, CYP450) 酶系是一类亚铁血红素蛋白的超家族酶系,广泛存在于几乎所有生物体中,参与多种内源物质(保幼激素及其类似物、蜕皮甾酮、脂肪酸和信息素等)和外源物质(药物、环境毒物等)在生物体内的代谢(Danielson, 2002; Matthias *et al*, 2008; 刘晨晖等, 2010)。在 CYP450 众多的家族成员中,以 CYP1-CYP4 家族与药物代谢最为相关,其中, CYP1、CYP2 和 CYP3 酶家族承担着人体 2/3 药物的代谢(Guengerich, 2007; 樊慧蓉等, 2006)。目前,在甲壳动物中已被证实存在的 CYP450 基因只有 *CYP2* 和 *CYP4* 家族基因(冯艳艳等, 2014)。*CYP2* 家族是目前已知的 CYP450 家族基因中数量最大、种类最多、物种之间同源性最低的家族,参与多

种低分子化合物及药物在生物体内的代谢(周园等, 2002),其活性高低决定了药物的代谢速率,直接影响药物的清除率(李国昌等, 2004),从而影响治疗效果和毒性效应。同时,药物、环境污染物等诸多外界因素可诱导或抑制 CYP450 的活性,从而影响药物的相互作用,导致药物不良反应。研究药物与生物体药物代谢酶的相互作用,有助于阐明水产动物体内药物代谢的规律和机制(马玉忠等, 2008),对于保证水产养殖中安全合理用药、避免药物不良反应、保障水产品安全都具有重要价值。目前,海洋甲壳类有关药物与 CYP450 基因表达及其酶活性的研究十分有限,仅见中国对虾(李小彦等, 2010; 张喆等, 2012)和三疣梭子蟹(冯艳艳等, 2014),凡纳滨对虾有关 *CYP2* 基因的

* 国家虾产业技术体系专项(CARS-47)、山东省自主创新专项(2013CXC80202)、国家高技术研究发展计划“主要养殖甲壳类良种培育”(2012AA10A409)和公益性行业(农业)科研专项(201103034)共同资助。王 莹, E-mail: ham19840209@163.com

① 通讯作者: 李 健, 研究员, E-mail: lijian@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-04-22, 收修改稿日期: 2015-08-12

研究尚属空白。

恩诺沙星(Enrofloxacin, EF)为人工合成的第三代喹诺酮类广谱抗菌药,对多种水产动物致病菌具有较强的抑制效果,广泛用于水产动物病害防治。鉴于此,本实验选取恩诺沙星作为外源物质,研究其对凡纳滨对虾肝胰腺 *CYP2* 基因表达与其标志酶氨基比林-N-脱甲基酶(APND)活性的影响,为进一步了解甲壳类动物 *CYP450* 基因的功能和作用机制,探讨 *CYP450* 与药物之间的相互作用奠定基础,为药物在水产养殖上的合理使用及联用提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 健康凡纳滨对虾平均体重为(10.5±1.2) g,购自山东省潍坊市昌邑下营海丰水产养殖有限公司。实验前暂养7 d,充气,流水,水温为(26±1)°C,盐度为(25±1),pH为(8.0±0.4),每日投喂不含药物的配合饲料,投喂量为凡纳滨对虾体重的2%。

1.1.2 实验药品和试剂 恩诺沙星原粉,纯度≥98.5%,购于武汉刚正生物科技有限公司; TaKaRa *Taq*TM、PrimerScript[®] RT Reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time)和 TaKaRa SYBR[®] Premix Ex *Taq*TM II (Tli RNaseH Plus)均购自 TaKaRa 公司;氨基比林和 1-苯基-2-硫脲(PTU, 98%)、还原型辅酶(NADPHNa₄) (含量≥99.9%)、乙二胺四乙酸二钠(EDTANa₂)、 α -苯甲磺酰氟(PMSF)及 1,4-二硫苏糖醇(DTT) (99.5%)购自 Sigma 公司; Trizol Reagent 购自美国 Invitrogen 公司;二甲基焦碳酸酯(DEPC)处理水购自 Solarbio 公司;考马斯亮蓝试剂盒购自南京建成生物技术公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 实验仪器 日立 CF16RX 落地高速冷冻离心机,超微量紫外可见分光光度计, NanoDrop ND-2000C(基因有限公司),电泳仪(Bio-Rad),凝胶成像仪(Kodak Gel Logic 212 Imaging System),多功能样品匀质器(Precellys 24 Dual),酶标仪(Tecan), Applied Biosystems 7500 Real-Time 荧光定量 PCR 仪。

1.2 实验设计

1.2.1 给药方法 根据《新编渔药手册》(杨先乐, 2005)的推荐剂量,设计恩诺沙星低、中、高3个剂量梯度:高剂量组(60 mg/kg, HD)、中剂量组(30 mg/kg, MD)和低剂量组(15 mg/kg, LD),另设1个对照组(CK)。按照凡纳滨对虾每天每千克体重摄食 20 g 饲料计算,分别拌制不同剂量恩诺沙星药饵。实验用

400 尾凡纳滨对虾,平均饲养于1-8号养殖池,1、2号养殖池设为对照组,3、4号为高剂量组,5、6号为中剂量组,7、8号为低剂量组,暂养7 d。实验前随机取10尾凡纳滨对虾,取肝胰腺、肠、胃、肌肉等组织进行药物残留检测,确保无恩诺沙星、环丙沙星残留。实验组分别投喂不同剂量恩诺沙星药饵,对照组投喂等量基础饲料,每天早、午、晚各投喂1次,连续投喂7 d。

1.2.2 取样方法 分别于最后一次投喂后的1、3、6、9、12、24、48、96 h 取样,每个时间点随机取凡纳滨对虾6尾,迅速取肝胰腺组织于液氮中保存备用。

另取10尾健康对照组凡纳滨对虾,抽取0.3 ml 血淋巴置于预先装有等体积抗凝剂的离心管中,于5000 r/min 转速下离心5 min,弃上清液,保留血细胞,加入 Trizol 保存备用,同时,取肝胰腺、鳃、肌肉、甲壳、肠、胃、心脏和眼柄液氮保存,用于 RNA 提取,检测凡纳滨对虾 *CYP2* 基因在不同组织中的表达水平。

1.3 总 RNA 的提取与第一链 cDNA 的合成

取健康凡纳滨对虾各组织(血细胞除外)于液氮中研磨, Trizol 法提取总 RNA,按照 Invitrogen 说明书进行;用超微量紫外可见分光光度计(NanoDrop ND-2000C)检测总 RNA 的纯度和浓度;用 1.0%的 MOPS 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的质量及完整性。然后用 PrimerScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒去除基因组 DNA 后合成第一链 cDNA。产物于-40°C 冰箱中保存备用。

1.4 *CYP2* 基因 mRNA Real Time RT-PCR 定量检测

通过凡纳滨对虾转录组(编号: SRR346404)得到 *CYP2* 基因部分序列,设计特异性引物用于 RT-PCR 定量分析,选取 β -actin 为内参基因(表1)。

将各组凡纳滨对虾肝胰腺的 cDNA 用 DEPC 处理水稀释至 200 ng/ μ l,分别加入 SYBR Premix Ex *Taq*TM II (2 \times) 10 μ l, PCR 正反引物(10 μ mol/L)各 0.8 μ l, ROX Reference Dye II 0.4 μ l, cDNA 稀释模板 2 μ l, 灭菌水 6 μ l,配制成 20 μ l 体系反应液。荧光定量 PCR 反应条件为:95°C 30 s, 95°C 5 s, 60°C 34 s, 40 个循环。不同时间点同一样品的目的基因和内参基因均在同一个 96 孔板上进行,每个样品设 3 个平行。

1.5 APND 活性测定

肝胰腺 S9 的制备参照张喆等(2012)的方法进行。APND 活性的测定参照 Schenkman 等(1967)改进的方

表 1 凡纳滨对虾 *CYP2* 基因表达量分析所用引物
Tab.1 Primers used in the analysis of *CYP2* gene mRNA expression in *Litopenaeus vannamei*

引物 Primer	引物序列 Primer sequence(5'-3')
CYP2-F	GCAGTTTGCACAGACGTGTT
CYP2-R	CCATGCTGGGAAAACGATTA
β -actin-F	TGGACTTCGAGCAGGAGATG
β -actin-R	GGAATGAGGGCTGGAACAGG

法进行。使用考马斯亮蓝蛋白定量试剂盒(南京建成生物研究所)完成组织蛋白含量的测定。

1.6 数据处理与分析

采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析荧光定量数据, 用 SPSS 17.0 软件对实验结果进行单因素方差分析(当 $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著)。

2 结果

2.1 *CYP2* 基因表达量测定

2.1.1 *CYP2* 基因在凡纳滨对虾各组织中的表达 利用 RT-PCR 检测 *CYP2* 基因在凡纳滨对虾组织中的转录表达情况。结果显示, *CYP2* 基因在肝胰腺、甲壳、

肠、鳃、血淋巴、肌肉、胃、心脏和眼柄中均有表达。以血淋巴中基因表达量为参照, *CYP2* 在肝胰腺中表达量最高, 其次是胃, 在血淋巴中表达最低(图 1)。

2.1.2 不同剂量恩诺沙星对凡纳滨对虾肝胰腺中 *CYP2* 基因表达的影响 利用 RT-PCR 检测凡纳滨对虾在投喂不同剂量的恩诺沙星后肝胰腺中 *CYP2* 基因表达量的变化情况(图 2)。结果显示, 连续投喂恩诺沙星 7 d 后, 除 1 h、24 h 和 96 h 外, 实验组较对照组表达量均显著下调($P < 0.05$), 各剂量组在取样时间 9 h 表达量下调幅度最大且极显著低于对照组($P < 0.01$); 高剂量组除 96 h 外, 其他取样点的表达量均极显著低于对照组($P < 0.01$)。对于同一测定时间, 恩诺沙星对 *CYP2* 基因的抑制作用基本呈现剂量效应, 即高剂量组 > 中剂量组 > 低剂量组。

2.2 不同剂量恩诺沙星对 APND 活性的影响

由图 3 可知, 3 个剂量恩诺沙星对凡纳滨对虾肝胰腺 APND 活性呈现明显的抑制作用, 在取样时间 12 h, 各剂量组 APND 活性均达到最低值且极显著低于对照组($P < 0.01$)。9 h 后, 低剂量组和中剂量组酶活性均显著低于对照组($P < 0.05$), 高剂量组除 3 h 外, 其余各时间点酶活性均极显著低于对照组($P < 0.01$)。对于

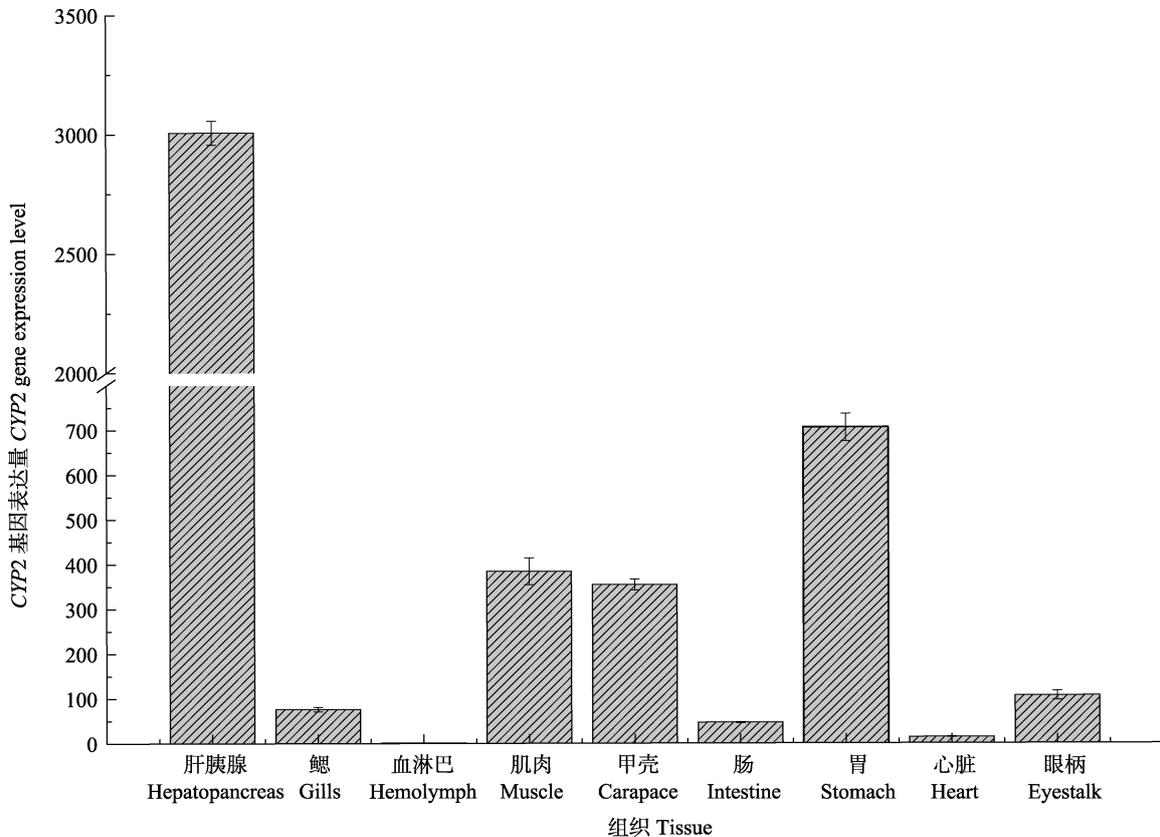


图 1 凡纳滨对虾 *CYP2* 基因在组织中的表达量
Fig.1 Levels of *CYP2* transcript in different tissues of *L. vannamei*

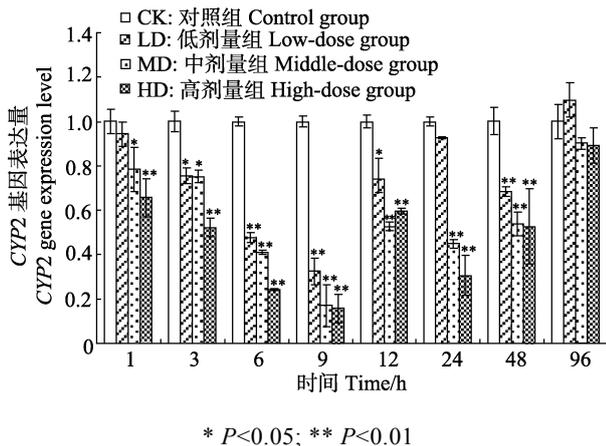


图2 不同浓度恩诺沙星对凡纳滨对虾肝胰腺
CYP2 基因表达的影响

Fig.2 The expression of *CYP2* gene in *L. vannamei* hepatopancreas after enrofloxacin administration

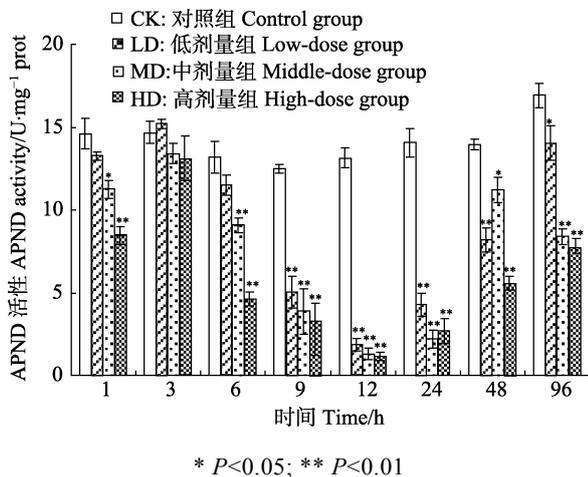


图3 不同浓度恩诺沙星对凡纳滨对虾肝胰腺
APND 活性的影响

Fig.3 The APND activity in *L. vannamei* hepatopancreas after enrofloxacin administration

同一时间点, 恩诺沙星对 APND 活性的抑制作用基本呈现剂量效应, 即高剂量组>中剂量组>低剂量组。

3 讨论

细胞色素 CYP450 是一个庞大的基因超家族, 在生物体中广泛分布且功能多样, 能够催化多种外源性化学物质以及内源化合物的氧化反应, 负责超过 80% 药物的代谢。CYP2 是 CYP450 超家族中一类重要的药物代谢酶, 在海洋无脊椎动物中的研究主要集中在基因克隆与功能分析方面。本研究首次从凡纳滨对虾转录组获得 *CYP2* 基因片段, 并通过 RT-PCR 方法研究其组织表达分布情况。结果显示, *CYP2* 基因在凡纳滨对虾体内呈组成型分布, 在肝胰腺中的表达量显

著高于其他组织。Gonzalez (1993) 研究发现, CYP2A1 只在哺乳动物的肝脏中表达; Brown 等(1998)研究了 CYP450 在鱼体各组织中的表达情况, 发现 CYP450 在脾和肾中表达水平较高; 朱磊等(2011)研究发现, CYP3A 在异育银鲫肝和肠组织中转录水平最高。Matsuo 等(2008)等对银大马哈鱼(*Oncorhynchus kisutch*) CYP1A、CYP2K1、CYP2M1 和 CYP3A27 的表达进行了研究, 发现 CYP1A、CYP2M1 和 CYP3A27 在各组织中均有表达, 而 CYP2K1 只在肝脏和嗅觉器官中表达。由以上研究可见, *CYP* 基因在不同种属生物体内的表达具有组织选择性, 肝脏作为药物代谢的重要器官, 其表达优势均强于其他器官, 这种表达优势是由不同器官的特异性功能决定的。

甲壳动物由于生活环境的特殊性会接触到许多外来物质, 生物体对外来物质的清除主要通过肝脏系统 *CYP450* 基因表达进行, 这些基因的酶产物催化外来物质极性化, 使之更易排出体外(范岚等, 2009)。同时, *CYP450* 的转录表达容易受到外源物质的影响, 外源物质可以诱导或者抑制 *CYP450*, 从而影响治疗效果或产生毒副作用。刘树民等(2006)发现, 黄药子可诱导大鼠肝脏中 *CYP2E1* 基因的表达, 黄药子和当归配伍后, *CYP2E1* 基因的表达下降。冯艳艳等(2014)研究发现, 磺胺嘧啶对三疣梭子蟹 *CYP2* mRNA 的表达有显著诱导作用, 且给药剂量越大, 基因上调水平越高。本实验研究了不同恩诺沙星剂量及作用时间对 *CYP2* 表达的调控, 发现该药物可显著抑制凡纳滨对虾体内 *CYP2* mRNA 的表达, 呈现出一定的剂量效应和时间效应, 这可能与给药次数多、时间长而导致药物在凡纳滨对虾体内的残留时间较长有关。恩诺沙星进入生物体后不断被 P450 酶代谢生成环丙沙星, 环丙沙星也进行自身的代谢, 使药物在机体内不断积累。给药浓度越高, 药物在组织中的积累量越多, 对 *CYP2* 的抑制作用越明显。随着给药时间的推移, 恩诺沙星及其代谢产物不断被药物代谢及转运链中的 III 相药物流出泵排出体外, 组织中药物浓度降低, 导致 *CYP2* mRNA 表达量慢慢升高至对照组水平。

在甲壳动物中, APND 主要反映 *CYP2* 家族同工酶的活性(冷欣夫等, 2001)。很多研究表明, 药物剂量能够显著影响药物对酶活性的影响。草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)连续注射剂量为 50 mg/kg 和 80 mg/kg 的利福平 3 d 后, 肝微粒体 APND 活性被诱导, 且随着药物浓度的升高呈现先升高后降低的趋势(Li et al, 2008)。韩华等(2010)研究发现, 黄芩苷对牙鲈 *CYP1A* 的诱导作用呈现出明显的剂量-效应关系, 药物剂量越高, 诱导作用越大。本实验在研究

恩诺沙星对凡纳滨对虾 APND 活性影响时也发现了这种剂量影响效应的现象, 凡纳滨对虾连续用药 7 d 后, 恩诺沙星对其抑制作用由高到低依次为: 高剂量组、中剂量组、低剂量组。在取样初期, 实验组 APND 活性即被抑制, 3 h 略有上升, 这可能是机体在受到外来物质刺激后所表现出的一种自我保护, 以此缓解抑制效应对生物体机能产生的影响。随着时间的延长, 药物在机体组织中的浓度不断升高, APND 活性的下降幅度更大, 在 12 h 各剂量组活性达到最低值且极显著低于对照组($P < 0.01$), 24 h 后 APND 活性逐渐升高。这与前述的 CYP2 基因表达量随剂量和作用时间的变化趋势基本一致。区别在于, CYP2 基因表达量在 9 h 达到最低值, 96 h 与对照组无差异; 而 APND 活性在 12 h 达到最低值, 96 h 仍显著低于对照组($P < 0.05$)。这可能是由于药物进入机体后首先刺激基因的转录过程, 进而影响蛋白质的翻译, 最终使酶的蛋白含量和活性降低, 所以, 恩诺沙星对 CYP2 基因的抑制效应在时间上早于对酶活性的抑制效应。这与漏芦(*Rhaponticum uniflorum*)抑制大鼠 CYP1A1 活性的机制类似(吴宁等, 2007)。

恩诺沙星作为第三代喹诺酮类药物, 以其卓越的疗效在水产养殖中得到广泛使用。近年来, 由于临床上与喹诺酮类药物联合用药的增多, 有关药物相互作用也随之出现, 酶抑制引起的药物相互作用约占全部相互作用的 70%。药物在体内主要靠 P450 酶进行代谢, 研究表明, 喹诺酮类药物对大鼠各组织中的 CYP2C 活性存在不同程度的抑制作用(姚欣等, 2006); 张喆等(2012)研究发现, 诺氟沙星对中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)肝胰腺、鳃及血清中的 APND、ECOD 酶均有显著抑制作用, 与本研究结果一致。但也有文献报道, 氟甲喹对虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)和异育银鲫(*Carassius gibelio*) EROD 活性具有诱导作用(Mouto *et al*, 1998; 胡晓等, 2011), 虽然同为喹诺酮类药物, 但该研究结果与本研究结果并不相同, 这可能与药物的分子结构及靶向动物不同有关。有关喹诺酮类药物抑制 P450 酶的机制, 目前尚不清楚。Fuhr 等(1993)认为, 喹诺酮类药物分子中 8 位上没有取代基(即萘啶环或奎啉环 C8 与一个氢相连)或者 7 位哌嗪基 3'和 4'无甲基等取代基, 则其抑制作用强, 这解释了为什么环丙沙星对 CYP450 有较强的抑制作用。对于恩诺沙星而言, 虽然其哌嗪环上 7 位哌嗪基的 4'位有 1 个乙基取代基, 但由于其在生物体内部分被 P450 酶代谢脱去乙基生成环丙沙星, 因此, 恩诺沙星仍表现出较强的抑制 CYP450 的能力。

本研究结果显示, 恩诺沙星对凡纳滨对虾 CYP2

mRNA 表达及 APND 活性呈现显著抑制作用, 且具有一定的时间和剂量效应, 提示恩诺沙星可能会导致一些经 CYP2 代谢的药物生物利用度增加, 从而有可能引起药物间的相互作用。此外, 恩诺沙星在凡纳滨对虾体内的代谢和残留规律表明, 其在凡纳滨对虾体内的半衰期长, 消除缓慢(赵海军等, 2010), 在药物联用中可能会导致药物相互作用更为严重。因此, 在养殖实践中, 当恩诺沙星与其他药物合并用药时, 应充分考虑恩诺沙星对 CYP2 的抑制作用, 而导致经其代谢的药物在对虾体内的蓄积和毒性增强。

参 考 文 献

- 马玉忠, 刘玉芝, 仲飞, 等. 安妥明对大鼠细胞色素酶 P450A1 的影响. 2008, 16(1): 82-84
- 冯艳艳, 李健, 张德宁, 等. 三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)CYP2 基因的 cDNA 克隆及表达分析. 海洋与湖沼, 2014, 45(5): 997-1005
- 朱磊, 胡晓, 房文红, 等. 异育银鲫 P450 家族 CYP3A136 基因的克隆与表达. 水产学报, 2011, 35(10): 1450-1457
- 刘树民, 张琳, 李颖, 等. 黄药子与当归配伍对大鼠肝脏 CYP1A2、CYP2E1 基因 mRNA 表达的影响. 中药药理与临床, 2006, 22(3): 97-98
- 刘晨晖, 乐江. 细胞色素 P450 CYP2E1 酶构型特征及其表达调控机制的研究进展. 中国药理学与毒理学杂志, 2010, 24(2): 155-160
- 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. 中国海洋大学学报, 2010, 40(3): 49-53
- 李国昌, 陈卫军, 蒲宇红. 细胞色素 P450 酶系与药物的代谢. 农垦医学, 2004, 26(1): 26-29
- 杨先乐. 新编渔药手册. 北京: 中国农业出版社, 2005, 199-210
- 吴宁, 李红梅, 吴青青, 等. 漏芦对细胞色素 P450 酶活性及 mRNA 表达影响. 中国公共卫生, 2007, 23(7): 827-829
- 冷欣夫, 邱星辉. 细胞色素 P450 酶系的结构、功能与应用前景. 北京: 科学出版社, 2001, 84-95
- 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
- 范岚, 谢海棠, 李智, 等. 黄芩苷对 Chang Liver 细胞 CYP3A4、CYP2C9 和 CYP2C19 表达的影响. 中国现代医学杂志, 2009, 19(23): 3546-3550
- 周园, 胡艳丽, 李丽燕, 等. 细胞色素 P450 酶的研究进展. 农垦医学, 2002, 24(3): 224-226
- 胡晓, 房文红, 汪开毓, 等. 氟甲喹对异育银鲫细胞色素 CYP450 主要药酶的影响. 中国水产科学, 2011, 18(2): 392-399
- 姚欣, 钱元恕. 氟喹诺酮类药物对大鼠肝外组织药物代谢酶的影响. 中国新药与临床杂志, 2006, 25(2): 87-90
- 韩华, 李健, 李吉涛, 等. 黄芩苷对牙鲈肝 CYP1A 酶活性及基因表达的影响. 中国水产科学, 2010, 17(5): 1121-1127
- 樊慧蓉, 和凡, 刘昌孝. Cocktail 探针药物法用于评价细胞色

- 素 P450 同工酶影响的研究进展. 中国药学杂志, 2006, 41(14): 1045–1048
- Brown DJ, Clark GC, Van Beneden RJ. A new cytochrome P450(CYP30) family identified in the clam, *Mercenaria mercenaria*. *Comp Biochem Phys C*, 1998, 121(1–3): 351–360
- Danielson PB. The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Curr Drug Metab*, 2002, 3(6): 561–597
- Fuhr U, Strobl G, Manaut F, *et al.* Quinolone antibacterial agents: relationship between structure and in vitro inhibition of the human cytochrome P450 isoform CYP1A2. *Mol Pharmacol*, 1993, 43(2): 191–199
- Guengerich FP. Cytochrome P450 and chemical toxicology. *Chem Res Toxicol*, 2007, 21(1): 70–83
- Gonzalez FJ. Cytochrome P450 evolution and nomenclature. Schenkman JB, Greim H. *Handbook of Experimental Pharmacology*. Berlin: Springer, 1993, 211–219
- Li D, Yang XL, Zhang SJ, *et al.* Effects of mammalian CYP3A inducers on CYP3A-related enzyme activities in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*): Possible implications for the establishment of a fish CYP3A induction model. *Comp Biochem Phys C: Toxicol Pharmacol*, 2008, 147(1): 17–29
- Matsuo AYO, Gallagher EP, Trute M, *et al.* Characterization of Phase I biotransformation enzymes in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Comp Biochem Phys C*, 2008, 147(1): 78–84
- Matthias D, Sabine E, Chimene A, *et al.* Cloning, expression and characterization of CYP102A7, a self-sufficient P450 monooxygenase from *Bacillus licheniformis*. *Appl Microbiol Biot*, 2008, 79(6): 931–940
- Mouto KA, Burke MD, Houlihan DF. Hepatic P450 monooxygenase response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) administered aquaculture antibiotics. *Fish Physiol Biochem*, 1998, 18(1): 97–106
- Schenkman JB, Remmer H, Estabrook RW. Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. *Mol Pharmacol*, 1967, 3: 113–123

(编辑 冯小花)

Effects of Enrofloxacin on the Expression Analysis of CYP2 and Activity of APND in *Litopenaeus vannamei*

WANG Ying^{1,2}, LI Jian^{2,3①}, GE Qianqian², ZHAI Qianqian², LI Dongli², GE Hongxing²

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. Function Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266200)

Abstract The cytochrome P450 is an important group of multi-functional oxidases engaged in the metabolism of exogenous substances. In this study we investigated the effects of enrofloxacin on the expression of CYP2 and activity of APND enzyme in hepatopancreas of *Litopenaeus vannamei*. Real-time PCR analysis revealed that CYP2 in *L. vannamei* was expressed in all tested tissues, including hepatopancreas, gills, hemolymph, muscle, carapace, intestine, stomach, heart and eyestalk. The expression level was the highest in hepatopancreas, and the lowest in hemolymph. After oral administration of enrofloxacin at different concentrations including 15 mg/kg (low-dose group), 30 mg/kg (middle-dose group), and 60 mg/kg (high-dose group), the level of CYP2 transcript in hepatopancreas decreased significantly ($P < 0.05$) especially at 9 h ($P < 0.01$), however exceptions occurred at 1 h, 24 h, and 96 h. The activity of APND that indicated the activity of CYP2 was measured with ELIASA. The result showed that the activity of APND was lower in the experimental groups than in the control group. APND activity in the high-dose group was lower than that in the low-dose group. All three experimental groups, especially the high-dose group ($P < 0.01$), showed a significant decrease in APND activity ($P < 0.05$) after 9 h, but an exception occurred at 3 h. The enzyme activity in all experimental groups was reduced ($P < 0.01$) and reached the minimum level at 12 h. Changes in both the enzyme activity and the expression level displayed the same pattern. These results indicated that the expression of CYP2 could be impacted by enrofloxacin. Therefore, when administrating drugs in combination, the cumulative effects should be carefully evaluated.

Key words *Litopenaeus vannamei*; CYP2; Tissue distribution; Enrofloxacin; Enzyme activity of APND

① Corresponding author: LI Jian, E-mail: lijian@ysfri.ac.cn