

# 呋喃西林代谢产物在中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*)体内的 消除规律及其对代谢酶活性的影响\*

李东利<sup>1,2</sup> 李 健<sup>2①</sup> 常志强<sup>2</sup> 孙 铭<sup>2</sup> 王 莹<sup>2</sup> 葛红星<sup>2</sup>

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306;

2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

**摘要** 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)以 30 mg/kg 体重剂量投喂呋喃西林药饵 5 d 后,检测对虾各组织中呋喃西林代谢物氨基脒(Semicarbazide, SEM)浓度和肝胰腺中的药物代谢酶活性。结果显示,肝胰腺中药物起始和达峰浓度最大,远远高于其他各组织。20 d 实验结束时,SEM 浓度依次为肌肉>鳃>甲壳>血淋巴>肝胰腺,消除半衰期为肌肉(5.89 d)>甲壳(4.66 d)>鳃(2.95 d)>血淋巴(2.70 d)>肝胰腺(1.47 d),肝胰腺中 SEM 消除最快,肌肉中消除最慢,药物残留时间较长。与对照组相比,给药组肝胰腺中乙氧基香豆素-O-脱乙酰酶(ECOD)和氨基比林-N-脱甲基酶(APND)活性均呈现先下降后上升的趋势,停药 3 h 时,ECOD 活性极显著低于对照组( $P<0.01$ ),酶活性被最大程度抑制,随后出现上升趋势,并分别于 48、72、96、120、240 h 时,ECOD 活性均极显著高于对照组( $P<0.01$ );APND 在停药 6 h 和 9 h 时活性最低,被抑制效应最大( $P<0.01$ ),240 h 时极显著高于对照组( $P<0.01$ ),之后 APND 活性降低并趋向对照组水平。结果表明,SEM 在中国对虾体内消除缓慢,消除半衰期较长,并对 ECOD、APND 酶活性有影响,推测 ECOD、APND 参与呋喃西林在中国对虾体内的代谢消除。

**关键词** 中国对虾;呋喃西林;氨基脒;消除规律;细胞色素 P450

**中图分类号** S912 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)05-0087-08

呋喃西林(Nitrofurazone, NFZ)是硝基呋喃类药物,曾用作饲料添加剂来防治水生动物疾病,也曾广泛应用于畜禽、水产养殖业中。NFZ 进入动物体内数小时就代谢为氨基脒(Semicarbazide, SEM)(樊新华等, 2010),对原药检测难度较大,因此,一般通过检测其代谢产物 SEM 来检测 NFZ 的残留。SEM 与动物体内蛋白质紧密结合形成稳定的化合物,该化合物不易被机体代谢消除,具有致癌、致突变作用,会对人体造成

危害(Bock *et al*, 2007; Barbosa *et al*, 2007)。自 20 世纪 90 年代中期起, NFZ 就被欧盟禁止用于食用动物的治疗(van Koten-Vermeulen *et al*, 1993),我国农业部于 2002 年发布第 193 号公告,将呋喃西林列入食品动物禁用兽药,2003 年又将水产品中硝基呋喃代谢物纳入残留监控计划中。近年来,中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)养殖过程中虾病频繁暴发,导致养殖对虾大量死亡,因此广大渔民对预防、治疗虾病的药物需

\* 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)、2013 年中国水产科学研究院院级基本科研业务费专项“鲆鲽鱼类磺胺药代谢模式及种间评估”(2013A1102)和公益性行业(农业)科研专项(201103034)共同资助。李东利, E-mail: 15063903531@163.com

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

收稿日期: 2014-11-21, 收修改稿日期: 2014-12-03

求迫切。硝基呋喃类药物虽已被禁用,但因其价格低廉、抗菌效果好、容易获得,在水产养殖中屡禁不止,违禁药物滥用使对虾产品质量存在安全隐患。因此,有必要研究 NFZ 在中国对虾体内的代谢消除规律。

药物在体内的代谢消除受到多种因素的影响,其中,药物代谢酶是药物体内代谢过程的关键因素。细胞色素 P450(CYP450)酶系参与药物代谢 I 相反应中多种内源性和外源性物质的转化和代谢,在机体解毒中起着重要作用(Werck-Reichhart *et al*, 2000)。在 CYP450 家族中, CYP 1-3 与外源物质的代谢有关,含量占肝 CYP450 酶总量的 70%(Ingelman, 2004),在维持机体内环境的稳态和代谢消除对机体有害物质中发挥重要作用。在甲壳动物中,通过测定 CYP1A 和 CYP2 标志酶 ECOD、APND 的活性来反应药物对机体影响的研究多有报道,如李小彦等(2010)研究发现,黄芩苷对中国对虾肝胰腺及鳃 APND、ECOD 酶活性均有不同程度的诱导作用,酶活性均呈现先升高后降低的趋势;Moutou 等(1998)研究了噁喹酸和氟甲喹等口服给药对虹鳟微粒体 CYP450 单加氧酶活性的影响,发现酶活性大大提高。CYP450 酶和药物代谢之间有着密切关系,药物可以诱导或抑制 CYP450 酶的活性,影响药物在体内的代谢消除速率和毒性反应。目前,硝基呋喃类药物在中国对虾体内的代谢消除与 CYP450 代谢酶类之间的关系鲜有研究报道。

本研究以中国对虾为实验对象,进行药饵给药,分析呋喃西林代谢物在中国对虾各组织中的残留消除规律,为 SEM 在中国对虾体内的代谢规律提供理论数据;从影响药物代谢的相关酶立足,初步确定参与该药物代谢的酶种类,有利于更深入地了解该药物的代谢特点,对发现潜在的药物利用价值具有重要意义,也为进一步研究硝基呋喃类药物安全性评价提供相关资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

健康中国对虾由山东昌邑海丰水产养殖公司提供,实验前无用药史。平均体重为(8.12±1.58) g,实验前暂养 7 d,暂养期间投喂不含药物的配合饲料(六和,青岛)。试验用水为自然海水,试验期间每天换水 1 次,连续充氧,试验水温为(30±1)°C,盐度为 28。

### 1.2 药品与试剂

呋喃西林(含量≥98%)、7-乙氧基香豆素(含量≥99%)、7-羟基香豆素(纯度≥99%)、氨基比林、1-苯

基-2-硫脲(PTU, 98%)和同位素内标 SEM·HCl-<sup>13</sup>C-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>(纯度≥99%)均购自 Sigma 公司;考马斯亮蓝、乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na<sub>2</sub>)、 $\alpha$ -苯甲磺酰氟(PMSF)(99%)购自 Amreco 公司;1,4-二硫苏糖醇(DTT)(99.5%)购自 Merck 公司;还原型辅酶(NADPH)(99%)、牛血清白蛋白购自 Roche 公司。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 各组织中 SEM 含量测定** 按照农业部 783 号公告-1-2006 的标准,采用液相色谱-串联质谱法进行检测。

实验分给药组和对照组,给药组准确称取 1.5 g NFZ 药粉,混合不含药物的饲料配制成 1000 g 浓度为 30 mg/kg·bw 的药饵连续投喂中国对虾 5 d,每天早晚各投喂药饵 1 次;对照组投喂不含药物的配合饲料,其他条件均一致。于停药后 1、3、6、9、12、24、48、72、96、120、240、480 h 取样,每次随机取 20 尾虾,分别取其血淋巴、肝胰腺、鳃、甲壳、肌肉,立即保存于-20°C 冰箱,用于药物残留检测。

组织样品在室温下自然解冻,称重并记录,取 2 ml 血淋巴于 50 ml 离心管中,加入 0.05 ml 混合内标工作溶液,涡旋混合 50 s,再加入 5 ml 盐酸溶液和 0.15 ml 2-硝基苯甲醛溶液,涡旋振荡 50 s,置于恒温水浴振荡器中 37°C 避光振荡 16 h。取出离心管冷却至室温,加入 4 ml 磷酸氢二钾溶液,调节 pH 至 7.2,加入 4 ml 乙酸乙酯,涡旋 50 s,4000 r/min 离心 5 min,取上清液转移至 10 ml 离心管中;再加入 4 ml 乙酸乙酯,重复上述操作,合并上清液,于 40°C 下氮气吹干。准确加入 1.0 ml 甲醇溶液,涡旋振荡溶解残留物,过 0.45  $\mu$ m 有机滤膜,待测。

色谱柱 Agilent XDB C<sub>18</sub>(100 mm×2.1 mm, 5  $\mu$ m),柱温为室温,进样量为 20  $\mu$ l。流动相 A 为 0.002 mol/L 醋酸铵溶液, B 为甲醇,梯度洗脱见表 1,平衡时间为 5 min。

表 1 流动相梯度洗脱程序

Tab.1 The gradient of the mobile phase

时间 Time(min)	A(%)	B(%)	流速 Flow rate( $\mu$ l/min)
0.0	80	20	250
3.0	20	80	250
5.0	20	80	250
5.1	80	20	250
7.0	80	20	250

质谱条件为大气压电喷雾离子源(ESI),正离子模式;喷雾电压为 4100 V,雾化气压力为 35 psi;辅

助气流量为 3 L/min; 离子传输毛细管温度为 350℃; 源内碰撞诱导解离电压为 10 V; 选择反应监测(SRM)母离子、子离子及碰撞能量见表 2; Q1 半峰宽为 0.7 Da, Q3 半峰宽为 0.7 Da。碰撞气为氦气, 压力为 1.5 mTorr。

表 2 选择反应监测母离子、子离子和碰撞能量

Tab.2 The parent and fragmentation combinations used for monitoring the selected reaction

目标化合物 Analyte	母离子 Parent ion ( <i>m/z</i> )	子离子 Production ( <i>m/z</i> )	碰撞能量 Collision energy (eV)
SEM	209	166*	11
	209	192	13
SEM- <sup>13</sup> C- <sup>15</sup> N <sub>2</sub>	212	168*	11

\* 定量离子碎片\*Quantitative ion fragments

**1.3.2 酶活性的测定** 给药组、对照组分别在停药后 1、3、6、9、12、24、48、72、96、120、240、480 h 随机取 12 尾虾, 取其肝胰腺, 置于液氮中保存, 用于 APND、ECOD 酶活性检测。

肝胰腺 S<sub>9</sub> (9000 g supernatant) 的制备采用沈钧等 (1997) 改进的方法, 肝胰腺用 4℃ 预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)(pH=7.4)反复冲洗, 尽可能除去血细胞, 用滤纸吸去肝组织表面的液体, 称重, 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 的 PBS, 含 1 mmol/L EDTA-Na<sub>2</sub>、1 mmol/L PMSF、1 mmol/L PTU、0.1 mmol/L DTT 和 15% 甘油), 将肝胰腺转入冷冻匀浆机, 4℃ 匀浆, 匀浆液在 4℃、13500 g 离心 25 min, 将漂浮的酯类物质用吸管除去, 将上清液转入预冷的离心管中, 即制成 S<sub>9</sub> 部分, 分装于冻存管中, 置于-80℃ 保存备用。

ECOD 活性测定(Oberdorster *et al*, 2000): 反应在 96 孔酶标板(黑板)中进行, 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 S<sub>9</sub> 部分 10 μl, 27℃ 孵育 5 min, 测定管中加 10 mmol/L 的 NADPH 10 μl, 空白管加缓冲液, 37℃ 水浴 10 min, E<sub>x</sub>=380 nm、E<sub>m</sub>=460 nm 测定其产物 7-羟基香豆素的浓度。

APND 活性测定(Schenkman *et al*, 1967): 取 0.1 mol/L PBS(pH=7.4)缓冲液 1.7 ml, 加 S<sub>9</sub> 蛋白悬液 0.1 ml, 氨基比林(24 g/L) 0.1 ml, 25℃ 水浴 2 min 后, 测定管中加 10 mmol/L 的 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 5000 r/min 离心 10 min, 取上清液 2.0 ml, 加 Nash 试剂 2.0 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。

## 1.4 数据处理

实验所得数据采用 Microsoft Excel 2003 处理, 绘制药-时曲线, 求出消除速率常数( $\beta$ )和消除曲线方程, 计算消除半衰期( $t_{1/2}$ )。用 SPASS 11.5 软件、样品 T 检验来分析酶活数据。

## 2 结果

### 2.1 SEM 含量检测

**2.1.1 SEM 在中国对虾体内的分布及残留** 药-时曲线见图 1, 各组织中 SEM 浓度随时间呈先增加后降低的趋势, 对照组各组织均未检出 SEM。其中, 肝胰腺中 SEM 残留量起始浓度和达峰浓度均最大, 1 h 时浓度为(832.62±3.06) μg/kg, 9 h 达到药物浓度高峰, 为(1554.61±6.29) μg/kg, 远远高于其他组织, 随后开始下降; 鳃中药物浓度分别在 3、12、48 h 表现出 3 个药峰, 浓度分别为(162.53±15.51)、(108.91±5.07)、(93.46±8.20) μg/kg, 3 个药峰浓度呈依次递减的趋势; 肌肉中药物浓度分别在 3 h、12 h 出现药峰, 药峰浓度依次为(149.95±11.28)、(87.04±7.02) μg/kg; 血淋巴中 SEM 浓度在 3 h 时达到最大值, 浓度为(56.12±12.79) μg/kg, 之后浓度逐渐降低; 甲壳中 SEM 浓度在 3 h 出现药峰, 之后降低, 从 9 h 又开始上升, 至 24 h 再次出现药峰, 其浓度高于 3 h 的药峰浓度。20 d 实验结束时, 各组织中残留量依次为肌肉(11.09±0.47) μg/kg>鳃(1.77±0.53) μg/kg>甲壳(1.56±0.66) μg/kg>血淋巴(0.69±0.13) μg/ml>肝胰腺(0.55±0.07) μg/kg,

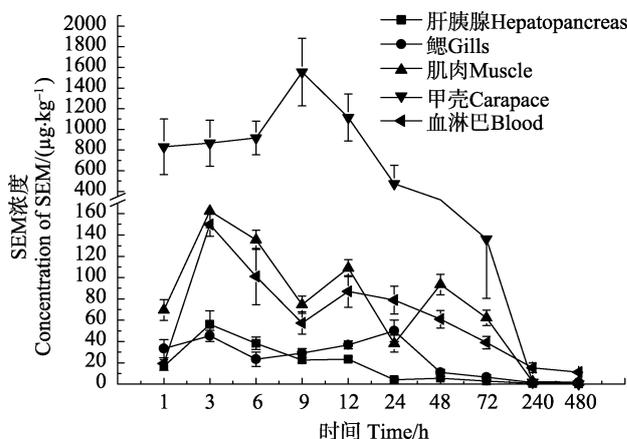


图 1 连续给药 5 d 后 NFZ 代谢物 SEM 在中国对虾各组织中的药物浓度

Fig.1 Concentrations of SEM in several tissues of *F. chinensis* after continuous dose of NFZ for 5 days

肌肉中残留量最多。

**2.1.2 SEM 在中国对虾各组织中的消除** 对给药组数据拟合, 得到 SEM 在中国对虾各组织中的消除方程、消除速率常数、相关系数和消除半衰期(表 3)。其中, SEM 在肝胰腺中消除半衰期最短, 消除速率最快; 在肌肉中消除半衰期最长, 消除也较慢, 消除半衰期依次为: 肌肉(5.89 d)>甲壳(4.66 d)>鳃(2.95 d)>血淋巴(2.70 d)>肝胰腺(1.47 d)。

表 3 SEM 在中国对虾各组织中的消除方程与消除参数  
Tab.3 The equations of elimination curves and parameters of SEM in tissues of *F. chinensis*

组织 Tissue	消除方程 Equation	$\beta$	$r^2$	$t_{1/2}(d)$
肌肉 Muscle	$C_{(t)}=82.983e^{-0.005t}$	0.005	0.819	5.89
甲壳 Carapace	$C_{(t)}=17.725e^{-0.006t}$	0.006	0.648	4.66
鳃 Gills	$C_{(t)}=100.275e^{-0.001t}$	0.010	0.844	2.95
血淋巴 Plasma	$C_{(t)}=16.916e^{-0.011t}$	0.011	0.786	2.70
肝胰腺 Hepatopancreas	$C_{(t)}=863.543e^{-0.02t}$	0.020	0.948	1.47

注:  $\beta$  为最终消除速率常数,  $t_{1/2}$  为消除半衰期,  $r^2$  为相关系数

Note:  $\beta$ . Final elimination rate constant;  $t_{1/2}$ . Elimination half-life;  $r^2$ . Correlation coefficient

**2.2 中国对虾肝胰腺 ECOD、APND 酶活性变化**

**2.2.1 肝胰腺 ECOD 酶活性变化** 在连续药饵给药呋喃西林 5 d 后, 中国对虾肝胰腺 ECOD 活性与对照组相比呈先下降后逐渐上升的趋势(图 2), 随着时间延长其变化趋势逐渐变小, 停药 1 h 时, 给药组 ECOD 活性显著低于对照组水平( $P<0.05$ ), 3 h 时极显著低于对照组水平( $P<0.01$ ), 随后便恢复到对照组水平并继续升高; 从停药后 48 h 开始, 其活性便大于对照组, 并分别于 48、72、96、120、240 h 时, 给

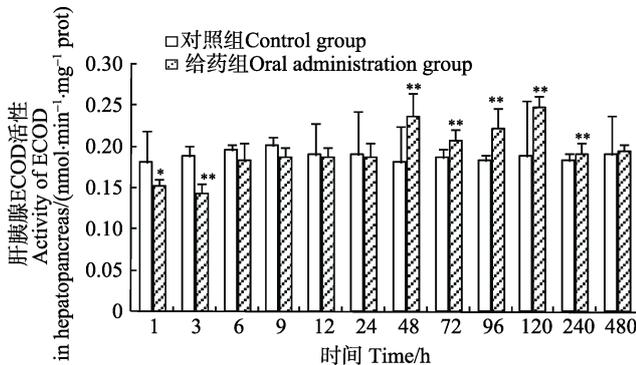


图 2 呋喃西林药饵给药后中国对虾肝胰腺 ECOD 活性变化

Fig.2 The variation of ECOD activity in hepatopancreas of *F. chinensis* after nitrofurazone oral administration

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ,  $n=6$

药组 ECOD 活性均极显著高于对照组( $P<0.01$ ), 480 h 实验结束时, 给药组 ECOD 活性高于对照组水平, 但无显著性差异。

**2.2.2 肝胰腺 APND 酶活性变化** 中国对虾连续药饵给药呋喃西林 5 d 后, 中国对虾肝胰腺 APND 的活性如图 3 所示, 与对照组相比, 给药组 APND 活性大致出现先降低后升高的趋势。在停药后 6、9 h 时, 对 APND 活性抑制作用最大, 在这两个时间点, 其 APND 酶活性极显著低于对照组( $P<0.01$ ); 9 h 后给药组 APND 活性逐渐升高, 短时间内与对照组相比无显著性差异。从 48 h 开始, 给药组 APND 活性高于对照组水平; 96 h 时, 给药组 APND 活性显著高于对照组( $P<0.05$ ), 240 h 时极显著高于对照组( $P<0.01$ ), 之后 APND 活性降低并低于对照组水平。

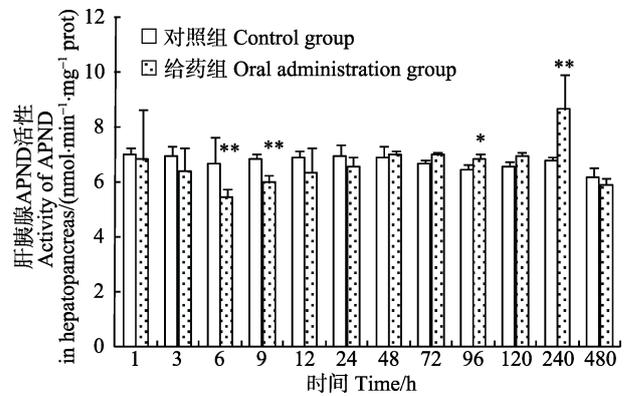


图 3 呋喃西林药饵给药后中国对虾肝胰腺 APND 活性变化

Fig.3 The variation of APND activity in hepatopancreas of *F. chinensis* after nitrofurazone oral administration

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ,  $n=6$

**3 讨论**

**3.1 甲壳动物内源性 SEM**

于慧娟等(2012)研究发现, 氨基脲作为内源性物质, 普遍存在于甲壳类水产品中, 并检测到虾类样品中 SEM 的含量在未检出-370.4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  之间。SEM 作为呋喃西林残留的监测指标, 由于甲壳动物内源性 SEM 的存在, 无疑会影响甲壳类水产品质量检测的准确性。因此, 在对虾呋喃西林残留的监控与研究中, 应该考虑内源性 SEM 的存在并作出相应的对策。本研究中, 对空白对虾各组织进行了检测, SEM 水平低于检测限。

**3.2 多次给药后 SEM 在中国对虾体内的残留消除规律**

停药后, 呋喃西林代谢物 SEM 在对虾各组织中

迅速蓄积(图 1), 残留量呈现随时间延长而降低的趋势, 肝胰腺中药物起始浓度最大, 残留量变化也最大, 这与肝胰腺是体内药物代谢的主要器官有关, 大多数药物在肝内经过生物转化而被清除。

杨先乐等(2005)认为, 一部分药物吸收后可能直接进入肝脏, 另一部分因首过效应使得流经血液的药物也被运送到肝脏中, 从而导致肝脏中的药物浓度一直处在比血浆中高的水平。蒋原等(2008)研究发现, 克氏螯虾药浴给药硝基呋喃类药物后, 其代谢物在腮组织中起始浓度最高, 其次是肝胰腺。药浴给药时, 腮组织直接接触水流, 药物吸收转化较快, 起始浓度也较高, 药物到达其他组织还存在代谢途径和时间上的差异, 所以给药方式的不同, 可能是造成中国对虾和克氏螯虾硝基呋喃代谢物起始浓度组织差异的原因。

本研究中, 9 h 时肝胰腺中 SEM 浓度达到最大, 为 $(1554.61 \pm 326.85) \mu\text{g}/\text{kg}$ , 达峰浓度高于其他组织, 这与呋喃西林代谢物在凡纳滨对虾体内代谢及残留结果大致相同, 但在同样的给药剂量和给药方式下, 凡纳滨对虾肝胰腺中 SEM 含量在停药后 12 h 后才达到最高峰(王明兴等, 2013), 相比之下, 中国对虾肝胰腺 SEM 浓度达峰时间提前, 出现这种现象的原因可能与养殖水温有关。温度变化  $1^\circ\text{C}$ , 药物代谢速度增加 10% (Ellis *et al.*, 1978), 本研究水温为 $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ , 而王明兴等(2013)的实验水温为 $(28 \pm 2)^\circ\text{C}$ , 水温升高, 可能导致中国对虾体内物质代谢水平提高, 药物降解速度较凡纳滨对虾快。药物在机体内的残留消除受各种因素的影响, 其中, 水温的影响尤其重要。因此, 用药及其休药期的制定需考虑水温的影响。

孙铭等(2011)研究诺氟沙星在中国对虾体内的残留及消除规律时发现, 药饵给药( $30 \text{ mg}/\text{kg} \cdot \text{bw}$ )后, 中国对虾各组织中的消除半衰期分别为肝胰腺(32.75 h) > 肌肉(31.01 h) > 血淋巴(21.74 h)。方星星等(2004)研究恩诺沙星及其代谢物环丙沙星在中国对虾体内的药代动力学中指出, 恩诺沙星在肝胰腺中分布较多, 在肝胰腺和肌肉中的消除半衰期分别为 52.7、19.7 h。李娜等(2008)研究指出, 米诺沙星在中国对虾肝胰腺、肌肉和血淋巴中的消除半衰期分别为 111.262、12.255 和 11.678 h。李静云等(2006)研究发现, 中国对虾药饵给药氟苯尼考后, 其肝胰腺、血淋巴和肌肉中的消除半衰期分别为 11.03、9.07 和 8.925 h。相比之下, 呋喃西林代谢物 SEM 在中国对虾肝胰腺中消除较快( $t_{1/2}=35.28 \text{ h}$ ), 在其他组织中均比诺氟沙星、恩诺沙星、米诺沙星和氟苯尼考等药物消除慢。从本研究可以得出, 呋喃西林代谢物 SEM 在中国对虾可食组织肌肉中残留时间长, 并且短时间内不易消除, 停药

20 d 时, 肌肉、鳃、甲壳中 SEM 含量大于检测限, 血淋巴、肝胰腺中 SEM 含量已低于  $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

蒋原等(2008)在研究硝基呋喃类药物在克氏螯虾组织中的消除规律发现, SEM 在克氏螯虾腮和虾肉中于 336 h 后无法检出, 肝胰腺中 168 h 后无法检出。邢丽红等(2012)研究呋喃西林在海参体内的代谢消除规律时发现, 300 d 时, SEM 含量才低于  $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。刘书贵等(2013)发现, 呋喃西林药浴给药杂交鳢(斑鳢♀×乌鳢♂), 60 d 后 SEM 在杂交鳢肌肉中低于检测限。谭志军等(2008)研究呋喃西林和呋喃唑酮代谢物在大菱鲆组织中的消除规律发现, 消除 185 d 后, 大菱鲆体内 SEM 的残留量仍高于检出限。因此, 通过本研究可以说明, 呋喃西林代谢物 SEM 在中国对虾体内消除速率比克氏螯虾慢, 但其消除速率比海参、杂交鳢和大菱鲆等快, 表明呋喃西林代谢物 SEM 在虾体内比鱼类消除较快, 表现出明显的种属差异。一般认为, 低等动物对药物的降解和排泄能力要远远弱于高等动物, 如鱼可通过肾脏和呼吸器官等进行扩散和消除, 哺乳动物以肾脏的主动运转予以消除。虾类对硝基呋喃类药物的代谢速度出现了相对较快的现象, 这可能与对虾开放式血液循环系统有关, 也可能与药物和血浆蛋白、组织结合的能力差异等有关, 还需要进一步研究。

### 3.3 组织中药物浓度的多峰现象

鳃、肌肉、血淋巴、甲壳等组织药-时曲线均出现药物吸收多峰的现象(图 1), 在哺乳动物中关于药物吸收多峰的现象的研究较多。水产动物体内也有一些相似报道, 氯霉素在牙鲆体内的药代动力学及残留消除规律(刘秀红等, 2003)、氯霉素在草鱼和复合四倍体异育银鲫体内的比较药代动力学(李爱华, 1998)都出现药物吸收多峰的现象。周怀梧(1989)在药物吸收多峰现象的动力学研究中, 把这种现象解释为肠-肝循环、胃肠循环、多部位吸收等, 其中, 肠-肝循环(EHC)被认为是产生吸收多峰现象最可能的一种机制。禁药氯霉素在哺乳动物体内代谢大部分是与葡萄糖醛酸相结合, 形成的葡萄糖苷酸代谢物随胆汁进入肠管, 经肠道细菌和酶水解后一部分再吸收, 另一部分被消除(李涛, 1985), 如果药物再吸收的量足够大, 则会导致血药浓度一次或再次升高, 药-时曲线则出现多峰。肠-肝循环等引起的药物再吸收会延长药物在体内的作用时间, 延缓消除, 使得药物在体内的过程变得复杂。本研究呋喃西林代谢过程中 SEM 难以消除并且药-时曲线出现多峰现象, 与药物肠-肝循环产生多峰、延缓消除机制相对照, 提示肠-肝循环是

导致呋喃西林主要代谢产物 SEM 在中国对虾体内消除缓慢和药-时曲线出现多峰现象的可能原因之一。

### 3.4 肝胰腺 ECOD、APND 酶活性的变化

本研究中,呋喃西林在中国对虾体内代谢消除过程中对肝胰腺 CYP450 酶 ECOD、APND 的活性表现出抑制作用( $P<0.01$ ),之后活性开始升高,出现被诱导的情况,最后逐渐恢复至对照组水平,说明呋喃西林代谢过程中对 ECOD、APND 酶活性可能有“抑制后效应”,这可能与药物在体内的蓄积量有关,高浓度 SEM 抑制 ECOD 和 APND 的活性;SEM 降低到一定浓度,ECOD 和 APND 酶活性又开始升高。何秀婷等(2011)研究表明,诺氟沙星对阿部鲮鰈 APND 表现为低浓度诱导高浓度抑制的现象,与本结果类似。

ECOD、APND 都以 48 h 为界限,48 h 之前活性均被抑制,48 h 之后活性均被诱导,由此可以推断,ECOD 和 APND 在呋喃西林代谢过程中解毒作用机制可能相似。呋喃西林代谢物在 3 h 时对 ECOD 活性抑制作用最大,120 h 诱导程度最大;APND 活性在 6 h 时达到最大抑制水平,240 h 时诱导水平最大;呋喃西林代谢物对 APND 酶的影响需要一定时间才能达到最大程度,且 ECOD 发挥效应的时间较 APND 快,说明 ECOD 对呋喃西林代谢物的影响较为敏感。李小彦等(2010)在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研究发现,中国对虾肝胰腺 ECOD 的活性先于 APND 酶活性达到最高诱导水平,说明不同 CYP450 酶的底物与药物结合可能存在竞争,药物对不同 CYP450 酶的作用效应在时间上具有选择性。李健等(2012)发现,诺氟沙星在中国对虾肝胰腺中需要一定时间才对 APND 酶表现出抑制作用,但要快于 ECOD 发挥抑制效应的时间。相对于本研究而言,造成这种差异的原因可能是诺氟沙星与呋喃西林的代谢机制不同,对先后参与代谢的肝药酶产生的影响也就不同。

CYP450 酶的活性受到药物的诱导或抑制,其中抑制作用可通过抑制蛋白的合成、降低 CYP450 含量、影响药物氧化过程中电子传递及辅酶的合成。起初,呋喃西林及其代谢产物蓄积量较多,抑制了 ECOD、APND 的活性,使得酶活性降低,酶活性的降低反过来减弱了药物代谢消除速率,导致药物残留量蓄积;随着时间延长,药物对酶的抑制作用减弱,ECOD、APND 酶含量增加,活性增大,药物代谢消除加速,体内 SEM 合成中断,残留量逐渐减小。由此可见,在一定范围内,中国对虾肝胰腺中 ECOD、APND 活性随 SEM 浓度增大其活性降低,SEM 浓度降低到一

定程度时则出现诱导现象,呋喃西林及其代谢产物 SEM 的代谢消除和 ECOD、APND 酶活性之间存在反向动态平衡即此消彼长的现象。

### 3.5 药物对 CYP450 酶活性的影响

CYP450 酶诱导可以改变药物在机体内的生物转化速率,使得药物的作用降低或代谢物活性化使其毒性增加;酶抑制则增加药物的浓度,延长药物对机体的作用时间,药物引起的毒性反应发生率也随之增加。药物代谢酶 ECOD 和 APND 可能会使呋喃西林某些基因在体内的代谢特征发生改变,对药物的消除和毒性产生影响,导致药物在体内不易消除。CYP450 酶以肝微粒体中含量最高(宋振玉等,1994),如脊椎动物肝脏中 CYP450 酶含量分布较多(Arukwe, 2002; Oniz-Delgado *et al*, 2002)。李国昌等(2004)在细胞色素 P450 酶系与药物的代谢中提到肝脏中 CYP450 酶活性决定药物的代谢速率,与药物的清除率有直接关系。所以在药物体内消除过程的研究中,药物代谢酶对其产生的作用不容忽视。

一些环境污染物如有机化合物和农药等对鱼类 CYP1A 有一定的诱导作用。药物对 CYP450 影响的研究多有报道,如氟苯尼考对鲫 CYP2E1 活性有显著的抑制作用(陈大健等,2007),诺氟沙星对中国对虾鳃和血清 APND、ECOD 活性均具有抑制作用(张喆等,2012),喹诺酮类药物对牙鲆肝 APND 活性也有显著的抑制作用(韩华等,2009),恩诺沙星在草鱼体内外显著抑制 CYP2E1 活性(王翔凌等,2008)。药物对动物体内 CYP450 酶或抑制或诱导,其影响不尽相同,多数表现为抑制作用。本研究结果表明,呋喃西林的代谢影响对虾体内 APND、ECOD 酶的活性,推测 ECOD、APND 参与呋喃西林在中国对虾体内的代谢反应,所以在研究该类药物的代谢消除过程中,应该考虑到药物代谢酶对其产生的影响,这些结果为鉴定呋喃西林代谢酶提供了资料。

## 4 结论

本研究结果表明,中国对虾肝胰腺对呋喃西林代谢物 SEM 富集能力强,消除能力也较强,表现出较快的消除速率;SEM 在可食肌肉组织中消除缓慢,长时间保持残留,停药 20 d 时肌肉中含量仍高于检测限;SEM 对药物代谢酶 ECOD、APND 均表现高浓度抑制、低浓度诱导的现象,且 ECOD 对 SEM 影响发挥效应的时间较 APND 快,表明 ECOD、APND 参与 SEM 的代谢消除,并在时间上具有一定的选择性。

## 参 考 文 献

- 于慧娟, 李冰, 蔡友琼, 等. 液相色谱-串联质谱法测定甲壳类水产品中氨基脲的含量. 化学分析, 2012, 40(10): 1530-1535
- 王明兴, 吴晓萍, 廖艳, 等. 呋喃西林代谢物在凡纳滨对虾体内代谢及残留. 食品与机械, 2013, 29(1): 76-80
- 王翔凌, 杨先乐, 张宁, 等. 草鱼肝细胞中 CYP2E1 活性的诱导研究. 水生生物学报, 2008, 32(4): 469-474
- 方星星, 王群, 李健. 恩诺沙星及其代谢物环丙沙星在中国对虾体内的药代动力学. 水产学报, 2004, 28(B12): 35-41
- 邢丽红, 李兆新, 王英姿. 呋喃西林在海参体内的代谢消除规律研究. 中国渔业质量与标准, 2012, 2(4): 44-49
- 刘书贵, 吴仕辉, 郑光明, 等. 呋喃西林代谢物在杂交鳢(斑鳢♀×乌鳢♂)体内的残留消除规律研究. 华南农业大学学报, 2013, 34(2): 248-253
- 刘秀红, 王群, 李健. 氯霉素在牙鲆体内的药代动力学及残留消除规律研究. 集美大学学报(自然科学版), 2003, 8(4): 305-310
- 孙铭, 李健, 张喆, 等. 诺氟沙星两种不同给药方式在中国对虾体内的残留及消除规律. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2011, 41(5): 43-48
- 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(自然科学版), 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
- 李娜, 李健, 王群. 米诺沙星在中国对虾体内的代谢动力学及在养殖系统中的消除. 安徽农业科学, 2008, 36(24): 10480-10483
- 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. 海洋科学, 2012, 36(3): 81-88
- 李爱华. 氯霉素在草鱼和复合四倍体异育银鲫体内的比较药代动力学. 中国兽医学报, 1998, 18(4): 372-374
- 李涛. 兽医药物动力学. 哈尔滨: 东北农学院出版社, 1985, 22, 29
- 李静云, 李健, 王群, 等. 氟苯尼考 3 种不同给药方式在中国明对虾体内的药代动力学研究. 海洋科学, 2006, 30(7): 64-68
- 杨先乐, 湛嘉, 康继韬. 氯霉素在罗非鱼体内的代谢和消除规律. 水生生物学报, 2005, 29(3): 266-271
- 何秀婷, 程章, 聂湘平, 等. 诺氟沙星对阿部鳊鰕鳃 I 相、II 相酶活性及 CYP1A 和 P-gp mRNA 表达影响. 环境科学学报, 2011, 31(4): 846-853
- 沈钧, 徐佩佩, 金锡鹏. 肝脏中细胞色素 P450 测定方法的改进. 工业卫生与职业病, 1997, 23(4): 236-238
- 宋振玉, 刘耕陶. 代药理学. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1994, 74
- 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
- 陈大健, 王加才, 张萍, 等. 氟苯尼考对鲫鱼 CYP2E1 活性影响的药代动力学评价. 中国兽医科学, 2007, 37(3): 269-273
- 周怀梧. 药物吸收多峰现象的动力学研究. 现代应用药学, 1989, 6(2): 37-40
- 蒋原, 丁涛, 徐锦忠, 等. 硝基呋喃类药物在克氏螯虾组织中消除规律的研究. 畜牧与兽医, 2008, 40(2): 34-37
- 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. 海洋科学, 2009, 33(11): 48-54
- 谭志军, 翟毓秀, 冷凯良, 等. 呋喃西林和呋喃唑酮代谢物在大菱鲆组织中的消除规律. 中山大学学报(自然科学版), 2008, 47(Z1): 63-69
- 樊新华, 郑浩, 钱伟, 等. 呋喃西林代谢物氨基脲在中华绒螯蟹体内的衰减研究. 江苏农业科学, 2010(6): 368-370
- Arukwe A. Complementary DNA cloning sequence analysis and differential organ expression of beta-naphthoflavone-inducible cytochrome P4501A in Atlantic salmon (*Salmon salar*). Comp Biochem Physiol Toxicol Pharmacol, 2002, 133(4): 613-624
- Barbosa J, Moura S. Determination of nitrofurans in animal feeds by liquid chromatography-UV photodiode-array detection and liquid chromatography ion spray tandem mass spectrometry. Anal Chim Acta, 2007, 586(1-2): 359-365
- Bock C, Gowik P, Stachel C. Matrix-comprehensive in-house validation and robustness check of a confirmatory method for the determination of four nitrofurans metabolites in poultry muscle and shrimp by LC-MS/MS. J Chromatogr B, 2007, 856(1/2): 178-189
- Ellis AE, Roberts RJ, Tytler P. The anatomy and physiology of teleost. In: Roberts RJ(Ed). Fish Physiol. Balliere Tindall, London, 1978
- Ingelman SM. Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: the past, present and future. Trends Pharmacol Sci, 2004, 25(4): 193-200
- Moutou KA, Burke MD, Houlihan DF. Hepatic P450 monooxygenase response in rainbow trout administered aquaculture antibiotics. Fish Physiol Biochem, 1998, 18(1): 97-106
- Oberdorster E, Brouwer M, Hoexum-Brouwer T, et al. Long-term pyrene exposure of grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, affects molting and reproduction of exposed males and offspring of exposed females. Environ Health Persp, 2000, 108(7): 641-646
- Oniz-Delgado JB, Sarasquete C, Behrens A, et al. Expression, cellular distribution and induction of cytochrome P4501A (CYP1A) in gilt head sea bream *Spanls aurata* brain. Aquat Toxicol, 2002, 60(3-4): 269-283
- Schenkman JB, Remmer H, Estabrook RW. Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. Mol Pharmacol, 1967, 3(2): 113-123
- van Kotten-Vermeulen JEM, Wouters MFA, van Leeuwen FXR. Report of the 40th meeting of the joint FAO/WHO expert committee on food additives (JECFA). Geneva: World health Organization, 1993, 85
- Werck-Reichhart D, Feyereisen R. Cytochromes P450: a success story. Genome Biol, 2000, 1(6): 1-9

## The Elimination Rules of Nitrofurazone Metabolites and Its Effects on Activities of Metabolic Enzymes in *Fenneropenaeus chinensis*

LI Dongli<sup>1,2</sup>, LI Jian<sup>2①</sup>, CHANG Zhiqiang<sup>2</sup>, SUN Ming<sup>2</sup>, WANG Ying<sup>2</sup>, GE Hongxing<sup>2</sup>

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

**Abstract** In this study we explored the elimination rules of semicarbazide (SEM) and its effect on the activities of hepatopancreas enzymes in *Fenneropenaeus chinensis*. Experimental shrimps were fed with a diet supplemented with nitrofurazone for five days before they were randomly selected from the tank and sampled in different days after the last oral administration. The concentrations of SEM in the hemolymph, hepatopancreas, gill, muscle and carapace were measured with LC-MS/MS, and the activities of ethoxycoumarin O-deethylase (ECOD) and aminopyrine N-demethylase (APND) in the hepatopancreas were examined with UV spectrophotometry and fluorospectrophotometry. The results showed that 1 h post treatment, the mean concentrations of SEM in the shrimp tissues were in the order of hepatopancreas>gill>carapace>muscle>plasma. At the end of the 20th day post treatment, SEM was still detectable in all tissues and the order of the concentration was muscle>gill>carapace>plasma>hepatopancreas. The half life of the elimination phase in the muscle, carapace, gill, plasma and hepatopancreas was 5.89 d, 4.66 d, 2.95 d, 2.70 d and 1.47 d respectively. Our results indicated that the elimination of SEM was the fastest in the hepatopancreas and the slowest in the muscle, and that SEM remained in the body of *F. chinensis* for long. Compared to the control, the activities of ECOD and APND in the experimental group were first reduced, followed by an increase, and finally returned to the normal levels. The activity of ECOD in the experimental group was significantly lower than the control 1 h post treatment ( $P<0.05$ ), and the statistical significance was even greater than 3 h post treatment ( $P<0.01$ ). Afterward the activity was enhanced and became significantly higher than the control at 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, and 240 h ( $P<0.01$ ) post treatment. The activity of APND was significantly lower than the control at 6 h and 9 h ( $P<0.01$ ) but obviously higher at 96 h ( $P<0.05$ ) and 240 h ( $P<0.01$ ), and the final level was lower than the control at 480 h. These data suggested that SEM was eliminated slowly in *F. chinensis* and had an impact on the activities of ECOD and APND. Moreover, ECOD and APND may be involved in the metabolism of nitrofurazone.

**Key words** *Fenneropenaeus chinensis*; Nitrofurazone; Semicarbazide; Elimination rules; CYP450s

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