

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00392

氟甲喹对异育银鲫细胞色素 CYP450 主要药酶的影响

胡晓^{1,2}, 房文红¹, 汪开毓², 孙贝贝¹, 胡琳琳¹, 周帅¹, 周俊芳¹

1. 中国水产科学研究院 东海水产研究所 农业部海洋与河口渔业资源及生态重点开放实验室, 上海 200090;

2. 四川农业大学, 四川 雅安 625014

摘要: 在分析了氟甲喹腹腔注射后对异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)主要药酶活性影响的基础上, 从蛋白表达和 mRNA 转录水平探究了氟甲喹对 CYP1A(EROD)的诱导机制。以氟甲喹剂量 35 mg/kg 一次性腹腔注射异育银鲫 24 h 后, 肝微粒体的 7-乙氧基异吩唑酮-O-脱甲基酶(EROD)活性为 54.33 pmol/(mg·min), 显著高于对照组的 34.00 pmol/(mg·min)($P < 0.01$), 而红霉素-N-脱甲基酶(ERND)[177.98 pmol/(mg·min)]、氨基比林-N-脱甲基酶(APD)[934.40 pmol/(mg·min)]及 7-乙氧基香豆素-O-脱甲基酶(ECOD)[9.84 pmol/(mg·min)]与对照组[分别为 140.90 pmol/(mg·min)、850.71 pmol/(mg·min)和 8.93 pmol/(mg·min)]相比无显著性差异; 除肾组织中 ERND 活性高于肝脏外, 其他 CYP 亚型药酶活性(APD、EROD 和 ECOD)均以肝组织中最高。Western-blotting 印迹表明, 实验组肝脏中 CYP1A 蛋白含量明显高于对照组, 与酶活(EROD)相符合; 而肾、肠中没有检测到特异性条带。半定量 RT-PCR 结果显示, CYP1A mRNA 在肝、肾和肠均有表达, 但实验组与对照组并无明显差异。体外实验中, 不同浓度的氟甲喹与微粒体共孵育, 未见 EROD 活性与浓度、时间的依赖关系。综上推测, 氟甲喹对鲫鱼肝 CYP1A 的诱导是在翻译后水平, 可能是加强蛋白的稳定性。本研究旨在为氟甲喹在鱼类中的合理应用提供科学依据。[中国水产科学, 2011, 18(2): 392–399]

关键词: 细胞色素 P450; 异育银鲫; 氟甲喹; 诱导

中图分类号: S94

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)02-0392-08

细胞色素 P450(CYP450)是一种多功能酶系, 参与多种内源性和外源性化合物的氧化代谢。细胞色素 P450 家族包含许多同工酶, CYP1、CYP2 和 CYP3 三个家族在药物代谢中起着重要作用, 在参与药物代谢的同时, 还受着其他药物的影响, 或被诱导或被抑制。黑鲈(*Dicentrarchus labrax*)腹腔注射 80 mg/kg 剂量的 β -萘黄酮后, 其 CYP1A 酶活提高了 6 倍^[1], 而注射恩诺沙星其酶活则降低了 85%^[2]; 多氯联苯和阿特拉津对异育银鲫 P450 酶活有显著的诱导作用^[3], 而五倍子、复方抗菌剂则抑制其肝微粒体 CYP3A 活性^[4]。氟甲喹(Flumequine, FLU)是 1 种专用于动物的抗菌药,

由于其抗菌谱广、与其他抗菌药无交叉耐药性等特点, 广泛应用于水产动物的细菌性疾病的预防和治疗^[5]。药物的诱导或抑制作用, 将会改变与之配伍的药物的代谢, 影响着药物的毒性反应, 以及其在体内的消除速率。因此, 研究渔用药物对水产动物细胞色素 P450 活性及其诱导或抑制作用, 是了解渔药代谢及药物间相互作用的基础, 对临床合理用药和安全性评价具有理论意义和实用价值。本研究以异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)为实验对象, 采用单次腹腔注射给药, 比较分析了氟甲喹对肝、肠和肾组织药酶活性的影响, 并在蛋白表达和转录水平进一步探讨氟甲喹

收稿日期: 2010-05-31; 修订日期: 2010-07-05.

基金项目: 国家十一五科技支撑计划项目(2006BAD03B04-03); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(中国水产科学研究院东海水产研究所 2007M06).

作者简介: 胡晓, 硕士研究生, 研究方向为水产动物药理学. E-mail: head-shot@126.com

通讯作者: 房文红, 研究员. E-mail: whfang06@yahoo.com.cn

诱导肝 CYP1A 的机制,为氟甲喹在鱼类中的合理应用提供科学依据。

1 材料方法

1.1 试剂及仪器

氟甲喹原药为苏州恒益医药原料有限公司产品,纯度>97%; 7-乙氧基异吩唑酮和试卤灵购自 Sigma 公司; 7-乙氧基香豆素和 7-羟基香豆素购自 Fluka; 还原性辅酶 (NADPH)、红霉素和氨基比林购自上海生工生物技术有限公司; 兔抗大鼠 CYP1A1 多克隆抗体和 PVDF 膜均购自 Millipore 公司; 大鼠 GAPDH 单克隆抗体购自上海康成生物公司。其余试剂均为国药集团上海化学试剂公司产品,分析纯。超速冷冻离心机(Beckman Optima L-100XP); 垂直凝胶电泳系统(Bio-Rad Min-PROTEAN Tetra Cell); 荧光分光光度计(上海三科仪器有限公司, 970CRT); 紫外可见分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司, UV-2802S)。

1.2 实验动物

异育银鲫购自上海市郊青浦某养殖场,体质量 70~80 g。水温 25~27℃ 下饲养 4 周后用于实验。挑选体表无损、健康的 12 尾异育银鲫,随机分成实验组和对照组,每组 6 尾。实验组腹腔注射氟甲喹,给药剂量为 35 mg/kg,同时设立对照组。24 h 后在冰上采集肝、肠和肾组织样品,保存于-80℃ 备用。

1.3 微粒体制备

参照 Novi 等^[8]方法作了修改。肝、肠和肾组织用 4℃ 预冷的 1.15%KCl 漂洗后,按质量体积比 1:4 加入预冷的 1.15%KCl 匀浆,于 4℃、10 000 g 下离心 20 min,取出上清液,再于 4℃、105 000 g 下离心 60 min,沉淀即为微粒体。参照 Bradford 法^[6]测定微粒体蛋白浓度后,用 20%甘油(v/v)、1 mmol/L EDTA、100 mmol/L PBS(pH7.4)稀释微粒体至蛋白浓度为 10 mg/mL,于-80℃ 保存备用。

1.4 P450 酶活测定

1.4.1 氨基比林-N-脱甲基酶(APD)和红霉素-N-脱甲基酶(ERND) 测定方法参照 Tu 和 Yang^[7]。微粒体反应体系(2 mL)中含 70 mmol/L Tris-HCl、

0.07 mmol/L EDTA、5 mmol/L 氨基比林(或者 1 mmol/L 红霉素)、1 mg 微粒体蛋白,10 mmol/L NADPH(同时以蒸馏水代替作空白),于 37℃ 孵育 30 min 后,加入 0.2 mL、25%ZnSO₄ 终止反应。再加入 0.2 mL 饱和 Ba(OH)₂, 3 000 g 离心 5 min,取 1.4 mL 上清液与 0.6 mL Nash 试剂于 50℃ 下显色 30 min,紫外可见分光光度于 412 nm 测定吸光值。

1.4.2 7-乙氧基香豆素-O-脱乙基酶(ECOD) 除缓冲液为 0.3 mol/L Tris-HCl(pH7.4)外,其他均参照 Frank 等^[11]方法,荧光分光光度计于 Ex368 nm、Em456 nm 测定其产物 7-羟基香豆素浓度。

1.4.3 7-乙氧基异吩唑酮-O-脱乙基酶(EROD) 在参照 Lange^[8]方法上作了修改。反应体系(1 mL)中含 0.6 mg 微粒体蛋白、0.05 mol/L Tris-HCl (pH7.4)、6 μmol/L 7-乙氧基异吩唑酮,10 mmol/L 的 NADPH(同时以蒸馏水代替作空白),37℃ 孵育 5 min 后,加入等体积甲醇终止反应。5 000 g 离心 10 min,取上清液,荧光分光光度计于 Ex535 nm、Em586 nm 测定其产物试卤灵浓度。

1.5 CYP1A1 的 Western 免疫印迹

10 μg 微粒体蛋白经 5%、10%不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳后^[9],半干法转至 PVDF 膜上,以兔抗大鼠 CYP1A1 为一抗,HRP 标记的羊抗兔 IgG 为二抗,大鼠 GAPDH 单克隆抗体为内参抗体,ECL 荧光检测对应 CYP 亚型条带。采用 Quantity One 4.6 软件对条带进行光密度分析,以 Gauss 痕迹量表示蛋白的相对含量。

1.6 CYP1A 的 mRNA 表达

采用 Trizol 试剂(TAKARA 公司产品)分别提取肝、肠和肾组织总 RNA。经 DNase I(TAKARA)处理后溶于 DEPC 处理水,取 1 μL 进行 3%琼脂糖凝胶电泳检测质量。根据已公布的异育银鲫 CYP1A、β-actin cDNA 序列(GenBank 登录号分别为 DQ517445 和 AB039726)采用 Oligo 6.71 软件设计引物: CYP 1A: Primer(F)5'-ATCCCTTTCT TGCGTATCCT-3', Primer(R)5'-CGATCCATTCCG ATCTTTT-3'。β-actin: Primer(F)5'-AAGGGCCAG ACTCATCGT-3', Primer(R)5'-CAATCCCAAAGC CAACAG-3',上海生工生物技术有限公司合

成。以 Prime Script RT- PCR 试剂盒进行 RT-PCR, 产物经 1.5%琼脂糖电泳, 采用 Quantity One 4.6 软件对条带进行光密度分析, 以 Gauss 痕迹量的 CYP1A/ β -actin 表示 DNA 的相对含量。

1.7 微粒体体外孵育氟甲喹对 EROD 活性影响实验

在微粒体和 NADPH 的体外反应体系中, 分别加入不同浓度氟甲喹, 使其终浓度分别为 0 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$, 37℃ 下孵育, 分别在孵育后 0 min、2 min、5 min、10 min 和 20 min 取样测定其 EROD 活性, 每个时间点 2 个平行, 反应体系及酶活测定方法同“1.4.3 7-乙氧基异吩唑酮-O-脱乙基酶(EROD)”。

1.8 数据分析

数据采用 SPSS 13.0 软件进行显著性分析 (ANOVA), 以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm \text{SD}$)表示, 组间显著性差异以字母 a 表示($P < 0.01$)。Microsoft Office Excel 2003 绘图。

2 结果与分析

2.1 氟甲喹对异育银鲫组织中 P450 主要药酶活性的影响

采用 CYP 亚型酶的探针底物测定氟甲喹对异育银鲫肝、肠和肾等组织中 P450 药酶活性的影响 (表 1)。除肾组织中 ERND 活性高于肝脏外, 其他

表 1 氟甲喹作用下异育银鲫肝、肠、肾细胞色素 P450 酶活性
Tab. 1 CYP activities in liver, intestine and kidney microsomes from control and FLU-treated carp (*Carassius auratus*)
 $n=6$; $\bar{x} \pm \text{SD}$; pmol/min per mg protein

药酶 enzyme	肝 liver		肠 intestine		肾 kidney	
	氟甲喹 FLU	对照 control	氟甲喹 FLU	对照 control	氟甲喹 FLU	对照 control
ERND	177.98 $\pm$ 32.94	140.90 $\pm$ 22.89	< 50	< 50	213.63	187.89
APD	934.40 $\pm$ 173.29	850.71 $\pm$ 229.68	< 50	< 50	< 50	< 50
EROD	54.33 $\pm$ 5.42 ^a	34.00 $\pm$ 5.87	6.26 $\pm$ 1.76	6.01 $\pm$ 1.49	4.92	4.88
ECOD	9.84 $\pm$ 3.29	8.93 $\pm$ 2.77	0.61 $\pm$ 0.02	0.62 $\pm$ 0.40	0.79	0.71

注: "a"表示与对照组相比差异极显著($P < 0.01$), t 检验。
Note:^a Significantly different from control microsomes: $P < 0.01$ t -test.

CYP 亚型药酶活性(APD、EROD 和 ECOD)均以肝组织中最高, 且远高于肠和肾脏。在肝组织中, 给药组的 EROD 活性显著高于对照组($P < 0.01$), 平均酶活升高 60%; 而 ERND、APD 和 ECOD 活性没有显著性差异($P > 0.01$)。

2.2 氟甲喹对异育银鲫肝组织中 CYP1A 蛋白表达的影响

以给药组鲫肝 EROD 酶活最低和最高个体的微粒体样品、给药组 6 尾鲫肝微粒体等体积混合样品, 以及对照组 6 尾鲫肝微粒体等体积混合样品上样电泳, 每孔上样蛋白量均为 10 μg , 其微粒体 CYP1A 蛋白免疫印迹见图 1。结果表明, 肝 EROD 酶活最高的个体和混合样品的 CYP1A 蛋白条带明显深于对照组等体积混合样品, 即使是给药组 EROD 酶活最低的个体, 其 CYP1A 蛋白条

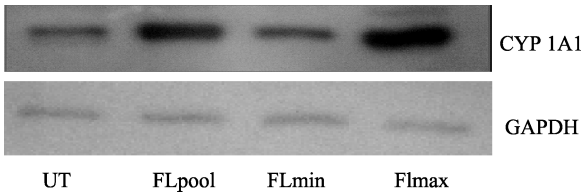


图 1 氟甲喹作用下异育银鲫肝组织中 CYP1A 的 Western 免疫印迹图
UT: 对照组 6 尾异育银鲫肝微粒体等体积混合样品; FLpool: 给药组 6 尾异育银鲫肝微粒体等体积混合样品; FLmin 和 FLmax: 分别表示给药组中 EROD 酶活最低个体和最高个体的肝微粒体样品。GAPDH 为内参。每孔上样蛋白量均为 10 μg 。
Fig.1 CYP1A Western blot from liver microsomal samples prepared from FLU-treated and control carps
UT: Pools of microsomes of 6 untreated fish. FLpool: Pools of microsomes of 6 flumequine treated fish. FLmin/FLmax: microsomes of flumequine treated individuals exhibiting the lowest/highest EROD activity. The protein content per well was 10 μg .

带也高于对照组等份混合样品。光密度分析显示(图 2), 实验组 CYP1A 蛋白平均表达量高于对照组 93%, 说明氟甲喹能使 CYP1A 含量明显上升, 与 EROD 酶活变化一致。采用同样的方法, 对肠和肾组织中微粒体进行了 Western 免疫分析, 结果并未检测到相应的 CYP1A 条带。

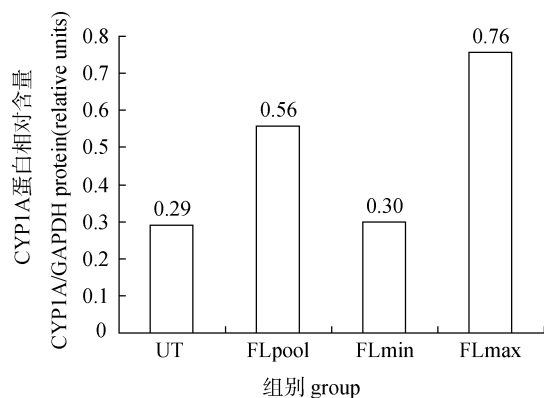


图 2 氟甲喹作用下异育银鲫肝组织中 CYP1A 的 Western 免疫印迹的光密度分析图

Fig. 2 Densitometric analysis of CYP1A protein from liver microsomal samples prepared from FLU-treated and control carps

2.3 氟甲喹对异育银鲫肝、肠和肾组织 CYP1A 基因表达影响

异育银鲫腹腔注射氟甲喹后, 其肝、肠和肾组织 CYP1A mRNA 的 RT-PCR 电泳图见图 3,

CYP1A mRNA 在肝、肠和肾组织中均有分布。采用 CYP1A mRNA 与 β -actin 光密度比值进行半定量分析, 对照组和实验组的肝、肠和肾组织 CYP1A mRNA 含量比值分别为: 0.927/1.060、1.479/1.490 和 1.210/1.300。相比氟甲喹对蛋白含量变化而言, 氟甲喹对 CYP1A mRNA 的影响不明显(图 3)。

2.4 氟甲喹对异育银鲫肝微粒体 EROD 活性体外影响

在体外微粒体体系中, 不同浓度氟甲喹与异育银鲫肝微粒体共同孵育后, 其 EROD 活性见图 4。由图可以看到, EROD 活性并没有随氟甲喹浓度与时间而发生变化, 即在体外微粒体体系中, CYP1A 不受氟甲喹的诱导或抑制。

3 讨论

采用特异的探针药物测定 CYP 各亚型酶活是研究 P450 的重要方法。本实验依据哺乳动物和鱼类 CYP1A 依赖的 7-乙氧基异吩唑酮-O-脱甲基酶 (EROD)^[8, 10-11], CYP2B 依赖的氨基比林-N-脱甲基酶 (APD)^[12-13], CYP1A、CYP2B 依赖的 7-乙氧基香豆素-O-脱甲基酶 (ECOD)^[8, 13] 以及 CYP3A 依赖的红霉素-N-脱甲基酶 (ERND)^[14] 研究了氟甲喹对异育银鲫 P450 各亚型酶活的影响。本实验除

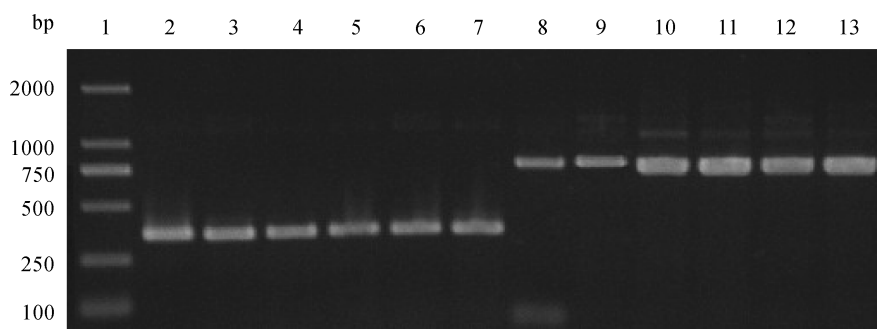


图 3 氟甲喹作用下异育银鲫肝、肠和肾组织 CYP1A 的 mRNA 及 β -actin RT-PCR 分析

356 bp 片段为 CYP1A mRNA; 770 bp 片段为 β -actin。条带从左至右依次为: 1: Marker 2000 (Takara); 2、4 和 6: 分别为对照组肝、肠和肾组织 CYP1A mRNA; 3、5 和 7: 分别为实验组肝、肠和肾组织 CYP1A mRNA; 8、10 和 12: 分别为对照组肝、肠和肾组织 β -actin; 9、11 和 13: 分别为实验组肝、肠和肾组织 β -actin。

Fig.3 RT-PCR analysis of CYP1A mRNA and β -actin in liver, intestine and kidney of untreated and FLU-treated carps (*Carassius auratus*)

The 356bp fragment corresponds to CYP1A mRNA and the 770bp fragment to constitutive gene (β -actin). Lane1: Marker 2000 (Takara); Lane 2-3: control /experiment group of liver CYP1A mRNA; Lane4-5: control /experiment group of intestine CYP1A mRNA; Lane 6-7: control /experiment group of kidney CYP1A mRNA; Lane 8-9: control /experiment group of liver β -actin; Lane 10-11: control /experiment group of intestine β -actin; Lane 12-13: control /experiment group of kidney β -actin.

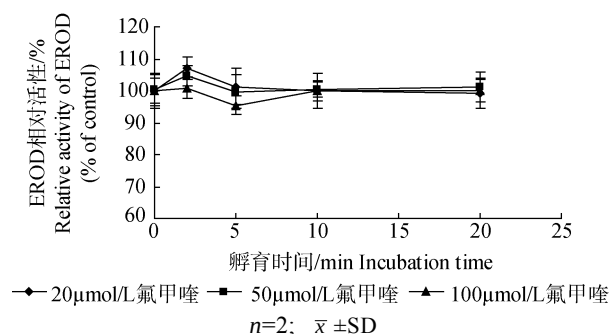


图 4 不同浓度氟甲喹与异育银鲫肝微粒体体外孵育下 EROD 酶活变化曲线

Fig.4 In vitro EROD activities of liver microsomes from *Carassius auratus* incubated with flumequine of different concentration

肾组织中 ERND 活性高于肝脏外, APD、EROD 和 ECOD 活性均以肝组织中最高, 这说明 P450 各亚型药酶在鲫鱼体内的分布存在组织差异性。肝脏是药物生物转化的主要场所, 通过细胞色素 P450 为主的 I 相氧化反应及谷胱甘肽转移酶等 II 相酶的结合反应, 使药物活性降低、水溶性增加以利于从肾脏排泄^[15]。在人和哺乳动物中, CYP3A 主要分布于肝脏和小肠^[16], 参与代谢超过 50% 的药物^[17]。Briubo 等^[18]曾证明, 鱼类的 CYP450 主要分布于肝、肾和鳃。本研究观察到的异育银鲫 P450 酶活分布与已有报道基本一致, 肝脏和肾脏组织中 CYP3A 的集中分布可能与该组织参与较多外源化学物质的生物转化和解毒代谢等生理功能有关。

喹诺酮类药物对人类 CYP1A2 的抑制作用已有报道, 恩诺沙星、诺氟沙星和氧氟沙星对人肝微粒体的抑制分别达到 74.9%、55.7% 和 11.8%^[19]。Moutou 等报道了氟甲喹和噁喹酸对虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) EROD 活性的影响, 饲料中分别添加 1.2 mg/g 和 1.0 mg/g, 连续投喂 10 d 后, EROD 活性分别升高了 4.2 倍和 8 倍^[10]。本研究报道了单剂量氟甲喹对异育银鲫 CYP1A 的诱导作用, 与人类中的结果相反, 但与虹鳟一致。CYP1A 是一类古老的家族, 在进化上, CYP1A 分为 3 个分支, 哺乳动物 CYP1A1、CYP1A2 以及鱼类 CYP1A。CYP1A1、1A2 的分化已有 1.2 亿年的历史, 而鱼类 CYP1A 的分化则在 3 亿年以前^[20]。药物效应

的不同或许与鱼类和哺乳动物 CYP1A 的差异有关。例如, 哺乳动物 CYP2B 的典型诱导剂苯巴比妥不能诱导鱼类 CYP2B, 相反却能够诱导鱼类的 CYP1A, 这可能与 Ah 受体的激活有关, 而 Ah 正是哺乳动物 CYP1A 的主要转录因子^[21]。

药物对鱼类 CYP1A 的诱导程度受多种因素影响有关。一方面, 不同种类鱼对诱导剂的敏感程度不同。5 mg/kg 的 β -萘黄酮分别使鲃鱼 (*Gobio gobio*) 雄鱼和雌鱼 EROD 活性上升了 15 倍和 10 倍^[22], 在黑鲈中上升了 4 倍^[1], 而在虹鳟中, 仅 50 μ g/kg 的 β -萘黄酮则使其活性上升了 25 倍^[23]。另一方面, 诱导还受性别、温度等因素影响。40 mg/kg 的 β -萘黄酮诱导沟篮子鱼 (*Siganus canaliculatus*) 其 EROD 上升了约 2 倍, 且雄鱼比雌鱼更易被诱导^[24], β -萘黄酮对虹鳟 EROD 的诱导作用在 17°C 较 5°C 快, 但低水温的诱导程度更高^[25]。本研究氟甲喹单剂量注射给药后异育银鲫 EROD 活性仅升高了 60%, 而虹鳟连续摄食 10 天含氟甲喹的饲料, 其 EROD 活性升高了 4.2 倍^[10]。由此看来, 对 EROD 诱导作用还可能与动物种类、给药剂量与方式、药物作用时间等因素有关, 今后尚需进一步研究。

鱼类和哺乳动物纯化的肝细胞色素 P450 还原酶具有相似的光谱、电泳及生物催化特性^[28]。本研究中, 采用 Western-blotting 验证了大鼠 CYP1A1 多克隆抗体与异育银鲫肝微粒体蛋白间的抗原抗体反应, 鼠源 P450 抗体在黑鲈、变色窄牙鲷 (*Stenotomus chrysops*) 和虹鳟的研究中也有成功应用的报道^[2, 10, 27]。Celandier 等^[29]报道了哺乳动物及人源的抗体 (大鼠 CYP3A1、人类 CYP3A4) 不仅能与纯化的虹鳟 LMC5 产生免疫反应, 同时也能识别虹鳟、变色窄牙鲷 (*Stenotomus versicolor*) 和大西洋鲑 (*Gadus morhua*) 肝微粒体中的 P450 蛋白。另外, 本实验还尝试了人类 CYP3A4 抗体对异育银鲫肝微粒体的作用, 但仅能检测到微弱的条带。这表明, 鱼类与哺乳动物之间 CYP3A 亚型有一定相似性, 同时鱼类种属之间也存在差异性。

外源物质对 CYP1A 的诱导发生在 3 个水平: 转录水平 (如转录激活)、转录后水平 (如 mRNA 的稳

定化或修饰)或翻译后水平(如蛋白的稳定化)^[1, 30]。本研究中, 在体内氟甲喹对异育银鲫 CYP1A 活性和蛋白含量具有诱导作用, 然而体外实验中并没有观察到氟甲喹对 CYP1A 活性的抑制作用, 这与氟甲喹在虹鳟中的研究结果^[10]一致。在此基础上, CYP1A mRNA 的半定量 RT-PCR 结果显示, 实验组 CYP1A mRNA 表达与对照组并无显著差异。综上结果, 笔者推测, 氟甲喹对 CYP1A 的诱导作用可能在翻译后, 与蛋白修饰(如蛋白稳定化)有关。

由此可见, 异育银鲫单剂量注射氟甲喹, 对 CYP1A 具有诱导作用, 经 CYP1A 代谢的药物, 其组织分布、消除速率可能会受到影响^[10]。目前联合用药已成为临床上重要的治疗手段, 当几种药物合用时, 药酶的诱导与抑制将改变药物的代谢, 可能使药物的疗效降低或者产生严重的不良反应。研究 CYP450 的诱导或抑制机制对临床合理用药、提高药物疗效和降低药物的毒副作用具有重要意义。

参考文献:

- [1] Novi S, Pretti C, Cognetti A M, et al. Biotransformation enzymes and their induction by β -naphthoflavone in adult sea bass (*Dicentrarchus labrax*)[J]. Aquatic Toxicol, 1998, 41(1): 63–81.
- [2] Vaccaro E, Giorgi M, Longo V, et al. Inhibition of cytochrome P450 enzymes by enrofloxacin in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*)[J]. AquaToxicol, 2003, 62(1): 27–33.
- [3] 舒耀皋. 几种农药对鲫鱼肝脏微粒体 P450 酶系的影响[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2008.
- [4] 唐江芳, 郑曙明. 复方抗菌剂对鲫鱼细胞色素 P4503A 活性的影响[J]. 水利渔业, 2007, 27(3): 105–107.
- [5] 杨先乐. 新编渔药手册[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 199–213.
- [6] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72(1-2): 248–254.
- [7] Tu Y, Yang C. High-affinity nitrosamine dealkylase system in rat liver microsomes and its induction by fasting[J]. Can Res, 1983, 43(2): 623.
- [8] Lange U, Goksøyr A, Siebers D, et al. Cytochrome P450 1A-dependent enzyme activities in the liver of dab (*Limanda limanda*): kinetics, seasonal changes and detection limits[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 1999, 123(4): 361–371.
- [9] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227(5259): 680–685.
- [10] Moutou K A, Burke M D, Houlihan D F. Hepatic P450 monooxygenase response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)) administered aquaculture antibiotics[J]. Fish Physiol Biochem, 1998, 18(1): 97–106.
- [11] Nannelli A, Chirulli V, Longo V, et al. Expression and induction by rifampicin of CAR and PXR regulated CYP2B and CYP3A in liver, kidney and airways of pig[J]. Toxicology, 2008, 252(1-3): 105–112.
- [12] HU Y Z, YAO T W. Induction of diphenyltriazol on cytochrome CYP1A[J]. Acta Pharmacol Sin, 2004, 25(4): 528–533.
- [13] Machala M, Nezveda L, Petřivalský M, et al. Monooxygenase activities in carp as biochemical markers of pollution by polycyclic and polyhalogenated aromatic hydrocarbons: choice of substrates and effects of temperature, gender and capture stress[J]. Aqu Toxicol, 1997, 37(2-3): 113–123.
- [14] Li D, Yang X L, Zhang S J, 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[J]. Compar Biochem Physiol, Part C, 2008, 147(1): 17–29.
- [15] Benet L Z, Kroetz D L, Sheiner L B. Pharmacokinetics: the dynamics of drug absorption, distribution and elimination, in Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutic (Hardman GH and Limbird LE eds)[M]. New York: McGraw-Hill Companies, 1996: 3–28.
- [16] Tseng H P, Hseu T H, Buhler D R, et al. Constitutive and xenobiotics-induced expression of a novel CYP3A gene from zebrafish larva[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2005, 205(3): 247–258.
- [17] Anzenbacher P, Anzenbacherová E. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics[J]. Cell Mol Life Sci, 2001, 58(5-6): 737–747.
- [18] Briubo E B. Metabolism-dependent blinding of the heteroerelie aine Trip-P.I in endothelial cells of choroids plexus and in large cerebral veins of cytochrome P450-

- induced mice[J]. Brain Res, 1994, 659(1-2): 91-98.
- [19] Fuhr U, Anders E M, Mahr G, et al. Inhibitory potency of quinolone antibacterial agents against cytochrome P4501A2 in vivo and in vitro[J]. Antimicrobial Agents Chemother, 1992, 36(5): 942-948.
- [20] Lewis D F V, Lake B G, George S G, et al. Molecular modelling of CYP1 family enzymes CYP1A1, CYP1A2, CYP1A6 and CYP1B1 based on sequence homology with CYP102[J]. Toxicology, 1999, 139(1-2): 53-79.
- [21] Williams D E, Lech J J, Buhler D R. Xenobiotics and xenoestrogens in fish: modulation of cytochrome P450 and carcinogenesis[J]. Mutat Res, 1998, 399(2): 179-192.
- [22] Flammarion P, Migeon B, Urios S b, et al. Effect of methidathion on the cytochrome P-450 1A in the cyprinid fish gudgeon (*Gobio gobio*)[J]. Aqu Toxicol, 1998, 42(2): 93-102.
- [23] Zhang Y, Andersson T, Forlin L. Induction of hepatic xenobiotic biotransformation enzymes in rainbow trout by [beta]-naphthoflavone. Time-course studies[J]. Compar Biochem Physiol Part B: Biochem Molec Biol, 1990, 95(2): 247-253.
- [24] Raza H, Otaiba A, Montague W. β -naphthoflavone- inducible cytochrome p450 1A1 activity in liver microsomes of the marine safi fish (*Siganus canaliculatus*)[J]. Biochem Pharmacol, 1995, 50(9): 1401-1406.
- [25] Andersson T, Koivusaan U. Influence of environmental temperature on the induction of xenobiotic metabolism by b-naphthoflavone in rainbow trout, *Salmo gairdneri*[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1985, 80(1): 45-50.
- [26] Snegaroff J, Bach J, Prevost V. Effects of chloramphenicol on hepatic cytochrome P-450 in rainbow trout[J]. Compar Biochem Physiol Part C: Comparative Pharmacology, 1989, 94(1): 215-222.
- [27] Stegeman J J, Hahn E H. Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: Current perspectives on forms, functions, and regulation of cytochrome P-450 in aquatic species, in Aquatic Toxicology, Molecular, Biochemical, and Cellular Perspectives[M]. Florida: Lewis Publishers, 1994: 87-206.
- [28] Sen A, Arinc E. Purification and characterization of cytochrome P450 reductase from liver microsomes of feral leaping mullet (*Liza saliens*)[J]. J Biochem Mol Toxicol, 1998, 12(2): 103-113.
- [29] Celander M, Buhler D R, Forlin L, et al. Immunochemical relationships of cytochrome P450 3A-like proteins in teleost fish[J]. Fish Physiol Biochem, 1996, 15(4): 323-332.
- [30] White R D, Shea D, Solow A R, et al. Induction and Post-Transcriptional Suppression of Hepatic Cytochrome P450 1A1 by 3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl[J]. Biochem Pharmacol, 1997, 53(7): 1029-1040.

Effects of flumequine on cytochrome P450 enzymes in allogynogenetic silver crucian carp, *Carassius auratus gibelio*

HU Xiao^{1,2}, FANG Wenhong¹, WANG Kaiyu², SUN Beibei¹, HU Linlin¹, ZHOU Shuai¹, ZHOU Junfang¹

1. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key and Open Laboratory of Marine and Estuarine Fisheries, Ministry of Agriculture, Shanghai 200090, China;

2. Animal Science and Technology College, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China

Abstract: The effects of flumequine on activities of several microsomal P450 monooxygenases of allogynogenetic silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) were determined and the induction of flumequine on CYP1A was further explored at the level of protein expression and mRNA transcription. After 24 h following a single intraperitoneal injection at a dose of 35 mg/kg, the ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity in the liver of the Crucian carp was 54.33 pmol/(mg·min), which was significantly higher than that of the control carps [34.00 pmol/(mg·min)] ($P < 0.01$). It was revealed that flumequine could significantly induce EROD activity ($P < 0.01$). However, the other P450 monooxygenases, such as erythromycin N-demethylase (ERND) [177.98 pmol/(mg·min)], aminopyrine N-demethylase [934.40 pmol/(mg·min)] and ethoxycoumarin O-deethylase (ECOD) [9.84 pmol/(mg·min)] were not significantly affected by flumequine, comparing with these activities in control [140.90 pmol/(mg·min), 850.71 pmol/(mg·min) and 8.93 pmol/(mg·min)], respectively. Except that the ERND activity in kidney tissue was higher than that in liver, the activities of APD, EROD and ECOD were the highest in liver tissue. An immunoblot analysis with rabbit anti-rat P4501A polyclonal antibody showed that CYP 1A protein expression in flumequine-treated carps was markedly higher than that in control carps, which was consistent with the trend in EROD activities. These findings suggest that P450 1A isoform, constitutively expressed in crucian carp, was particularly susceptible to activation by flumequine. Semiquantitative RT-PCR indicated that CYP1A mRNA was not affected by flumequine. In vitro assay, microsomes incubating with various concentrations of flumequine demonstrated that this fluoroquinolone antibiotic had no induction or inhibition of CYP1A. On the basis of the above, liver CYP1A induction of flumequine on carp occurs at the post-translation level, which may enhance protein stability. [Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(2): 392–399]

Key words: cytochrome P450; *Carassius auratus gibelio*; flumequine; induction

Corresponding author: FANG Wenhong. E-mail: whfang06@yahoo.com.cn