

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.16063

鲫血髓过氧化物酶的表达及其与血药浓度的关联性

刘腾飞^{1,2}, 马荣荣^{1,3}, 肖艳翼¹, 朱凤娇¹, 杨先乐¹, 胡鲲¹

1. 上海海洋大学 国家水生动物病原库, 上海 201306;

2. 藁城区农林畜牧局, 河北 石家庄 052160;

3. 中国水产科学院 东海水产研究所, 上海 200090

摘要: 为了研究在吡喹酮代谢过程中, 鲫血髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO) mRNA 表达与血药浓度的相关性, 以体重为(80±10.5) g 的鲫鱼(*Carassius auratus*)为试验动物, 单剂量(10 mg/kg)口灌吡喹酮(praziquantel, PZQ)后, 在鲫血液中选取 β -actin 为内参基因, 通过设计特异性引物, 利用荧光定量 PCR, 分析了不同时间点鲫血 MPO mRNA 水平的相对表达量的变化; 利用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)测定了吡喹酮在鲫鱼体内的血药浓度, 分析两者之间的相关性。结果显示, 吡喹酮能够迅速进入血液, 并被快速消除, 药时数据符合二室开放模型。在 1 h 时, 血液中吡喹酮的浓度达到最大值, 为 2.85 μ g/mL, 96 h 后血液中检测不到吡喹酮; 灌药后, MPO 基因表达量随时间呈先升后降趋势, 在 1 h 时髓过氧化物酶表达量最高。此外, 0.25 h、0.5 h、1 h、3 h 与 6 h 组与对照组差异性极显著($P<0.01$), 12 h 组与对照组差异显著($P<0.05$)。48 h 与 96 h 组与对照组差异不显著($P>0.05$)。相关性分析发现, MPO mRNA 相对表达量与血液中吡喹酮的浓度之间相关系数 $r=0.96$, 为高度相关, 并且推测 MPO 可能参与吡喹酮的氧化代谢。结论认为: (1) MPO mRNA 相对表达量的升高与外源性药物吡喹酮的摄入有关。(2) 血液中吡喹酮的残留量与 MPO mRNA 相对表达量线性相关。本研究旨在提供一种从分子水平评价水产动物体内药物残留的新思路。

关键词: 鲫; 髓过氧化物酶; 吡喹酮; 荧光定量 PCR; 血药浓度; 代谢

中图分类号: S94

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)06-1332-07

髓过氧化物酶(MPO)是一种由中性粒细胞、巨噬细胞、单核细胞分泌的血红蛋白, 常被作为一种免疫标志物研究^[1]。当机体处于应激或者炎症状态时, 分泌大量的 MPO 并激活。过氧化氢和氯离子在 MPO 的催化作用下产生的具有强氧化性的次氯酸等反应物质和自由基, 可以杀灭多种病原微生物, 从而参与机体的免疫应答过程^[2]。有研究表明, MPO 与 CYP450 具有极其相似的结构与功能^[3], CYP450 被看做是一种药物代谢酶, 因此 MPO 的表达与药物代谢是否有关, 成为人们日益关注的一个问题。近年来, 关于哺乳动物 MPO 的研究取得了显著进展, 在水产动物中亦有报道。然而, 关于 MPO 的研究大多集中在作为疾

病诊断的标示物方面^[4-6], 而 MPO 是否能作为药物代谢过程中的标示物, 目前尚未有相关报道。

吡喹酮(Praziquantel, PZQ)是一种异喹啉吡嗪衍生物, 为白色或类白色结晶性粉末, 在水中难以溶解, 却容易溶于多种有机溶剂, 口服具有刺激性。自 20 世纪 80 年代以来, 中国大陆开始生产吡喹酮。作为一种广谱抗寄生虫病药物, 已在水产养殖中广泛应用。吡喹酮对于杀灭三代虫、指环虫、绦虫等寄生虫有很好的作用, 并且对防治单殖吸虫引起的鳃疾病等极其有效^[7-11]。因此, 吡喹酮在水产养殖寄生虫病的防治中具有举足轻重的作用。本研究以吡喹酮为模式药物, 分析了鲫鱼在单剂量口灌吡喹酮后, 外周血 MPO 基因

收稿日期: 2016-03-02; 修订日期: 2016-04-11.

基金项目: 国家“863”计划项目(2011AA10A216); 公益性农业行业专项(201203085); 国家水质资源平台运行服务项目.

作者简介: 刘腾飞(1989-), 男, 硕士研究生, 主要从事鱼类免疫学与药代动力学研究. E-mail: 253079662@qq.com

通信作者: 胡鲲, 博士, 副教授. 研究方向为水产动物医学. E-mail: khu@shou.edu.cn

在 mRNA 水平的表达, 并且通过评价其相对表达量与吡喹酮浓度的关系, 尝试建立一种利用 *MPO* 基因评价鱼类体内药物残留的方法, 为健全水产养殖品安全用药技术提供一种新思路。

1 材料与方法

1.1 仪器与设备

Funglyn FTC-3000 实时荧光定量 PCR 仪、XI-ANG YI H1650-W 台式微量高速离心机、Eppendorf Centrifuge 5415D 离心机、净化 SW-CJ-2D 双人单面净化垂直送风工作台(苏州净化设备有限公司)、BIO-RAD Powerpac Basic 电泳仪系统、Aglient-1100 高效液相色谱仪(配备荧光检测器、自动进样器)、Eppendorf 旋转蒸发仪、Thermo fishier 漩涡混合器。

1.2 试剂与耗材

AXYGEN 0.2 mL thin wall, Single tubes/8 strip tubes (美国 Axygen 公司); TOYOBO ReverTra Ace® qPCR RT Kit Code No. FSQ-101, TOYOBO SYBR Green Realtime PCR Master Mix Code No. QPK-201 (日本 TOYOBO 公司); PZQ 标准品(≥ 99.9%), 购自 Sigma 公司; PZQ 原料药, 购自西安百川生物科技有限公司。

1.3 实验动物

实验所用鲫鱼取自上海海洋大学滨海养殖基地, 体重(80.0±10.5) g, 通过外表观察及解剖验证健康无伤, 且未用过任何药物, 实验前暂养于实验室循环水系统水族箱, 水温控制在(20±2)℃, 早晚喂食全价饲料, 于灌药前 1 天停止投饲。此外, 选取 10 尾投喂纯化饲料(不含维生素、矿物质等)。

1.4 给药与取样

将吡喹酮原料药先用少量乙醇预溶, 再用超纯水定容为 1 mg/mL, 同时加入少量食用色素以方便观察有无回吐。随机选取 45 尾饲养鲫鱼, 用带有塑料软管的注射器以 10 mg/kg 的给药剂量单次口灌吡喹酮, 给药 5 h 后恢复正常投饵, 并且分别于给药后 0.25 h、0.5 h、1 h、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h、96 h 尾静脉取血(每个时间点 5 尾), 每个时间点的血样均匀分为两份, -80℃ 超低温冰箱保存。选取 5 尾鲫鱼, 口灌少量乙醇与水的混合液, 设立为对照组。投喂纯化饲料的鲫鱼, 不予以

口灌, 设立为空白对照组。试验用鱼处理遵循《实验动物环境及设施》^[12]要求。

1.5 利用 *MPO* mRNA 的表达分析 *MPO* 在血液中的含量变化

1.5.1 通过 PCR 扩增克隆鲫 *MPO* 基因的 cDNA

按照 Trizol 法提取鲫血总 RNA, 并用无 RNA 酶的双蒸水溶解所得总 RNA。所得总 RNA 在 one drop 核酸蛋白测定仪上测定 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值, 保证其值在 1.8~2.0, 用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的丰度和完整性。用 TOYOBO ReverTra Ace® qPCR RT Kit Code No. FSQ-101 试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA。反应条件和体系皆参照试剂盒。将 β -actin 基因作为内参基因。用 PremierPrimer 5.0 软件设计 β -actin 和 *MPO* 引物。引物序列见表 1。

表 1 实验引物
Tab. 1 Experimental primers

引物名称 primer name	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	长度/bp size
<i>MPO</i> : forward primer	AGGAACCTTCGAGACCTGACCAA	163
<i>MPO</i> : reverse primer	AAGCAAGGCACCTCTGTTAAGG	
β -actin: forward primer	TTCCCTTGCTCCTTCCACCAT	125
β -actin: reverse primer	GCTTGCTGATCCACATCTGCT	

1.5.2 *MPO* 基因的实时 PCR 分析 利用以上两对引物进行实时荧光定量 PCR 分析。用 10 倍梯度稀释的对照组 cDNA 制作荧光定量 PCR 标准曲线。在 Funglyn FTC-3000 实时荧光定量 PCR 仪(加拿大枫岭生物)上进行定量扩增, 反应体系如下: cDNA 样品 2 μ L、2×Realtime PCR Master Mix 10 μ L、*MPO* forward primer 和 reverse primer 各 0.4 μ L, 加无 RNA 酶的双蒸水至 20 μ L。反应条件见表 2。扩增完成即对产物进行溶解曲线分析, 确定为特异性扩增。各个样品皆设 3 个重复, 没有加模板的作为阴性对照。利用内参基因对各时间点血样的 *MPO* 的 C_t 值均一化处理, 通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算不同血样中 *MPO* mRNA 的相对含量。

1.6 血样中吡喹酮残留量分析

基于高效液相色谱法(HPLC)分析口灌吡喹酮后不同时间点血液中 PZQ 浓度。前处理方法: 在 15 mL 离心管中加入 1 mL 血液和 3 mL 乙酸乙酯, 漩涡振荡 3 min 后用离心机离心 10 min (4500 r/min),

表 2 RT-PCR 反应条件
Tab. 2 Reaction conditions of RT-PCR

温度 temperature	时间 time	循环 cycle
95℃ (pre degeneration)	180 s	Stage 1 (1 cycle)
95℃ (denature)	5 s	Stage 2 (40 cycles)
60℃ (primer annealing)	30 s	
降温至 4~10℃ down to 4~10℃		

然后取上清。用 3 mL 乙酸乙酯对沉淀重复提取一次并合并上清液。将上清在旋转蒸发仪中以 45℃ 恒温条件蒸发至干, 先用 1 mL 流动相振荡溶解后再分别用 1 mL 正己烷 2 次去脂。获取合并下清液用微孔滤膜过滤, 置于进样瓶, 用高效液相色谱仪测定。色谱条件: 色谱柱是 Agilent Zorbax XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×150 mm×5 μm); 流动相为乙腈和水混合液, 比例为 50 : 50(V/V); 激发波长和发射波长分别为 265 nm、280 nm; 柱温: 25℃; 流速: 1 mL/min; 进样量: 20 μL。标准曲线的制备: 将吡喹酮标准品配置成质量浓度分别为 0.05 μg/mL、0.1 μg/mL、0.2 μg/mL、0.4 μg/mL、1 μg/mL、2 μg/mL、4 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL 的标准溶液, 分别测其峰面积, 然后以浓度为横坐标, 药物峰面积为纵坐标制作标准曲线, 求回归方程与相关系数, 用外标法测定样品药物浓度。

1.7 数据处理

通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对荧光定量数据进行分析, SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析, 各组平均样用 LSD 法进行多重比较。结果用平均值±标准误差($\bar{x}\pm SE$)表示。药动力学模型拟合、参数计算采用药代动力学程序软件 DAS3.0 的智能化分析系统。用皮尔森相关性检验分析相关性, $r>0$ 为正相关, $r<0$ 为负相关, $|r|\leq 0.3$ 为没有相关性, $0.3<|r|\leq 0.5$ 为低度线性相关, $0.5<|r|\leq 0.8$ 为显著线性相关, $|r|>0.8$ 为高度线性相关。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 提取结果

提取的鲫血总 RNA, one drop 核酸蛋白测定仪检测结果显示 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值在 1.8~2.0, 1%琼脂糖凝胶电泳得到 28S、18S、5S 共 3 条清晰条

带。说明提取的总 RNA 纯度较高并且完整, 满足进一步实验要求。

2.2 吡喹酮口灌处理后, 不同时间 MPO 基因的表达

将总 RNA 反转录为 cDNA 后, 以其为模板进行 RT-PCR, 对血液中的 β -actin 和 MPO 进行扩增, PCR 产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳, 结果如图 1 所示。荧光定量 PCR 结果显示, 鲫鱼 MPO 基因和内参基因的实时荧光定量 PCR 扩增曲线指数增长显著, 溶解曲线为单一峰, 扩增效率 E 值分别为 97.2%和 97.9%, 接近 1.0, 说明此实验条件下目的基因与内参基因的扩增效率一致, 符合作为标准曲线的要求。MPO 基因在各血液样品中均有表达。MPO 基因表达量随时间呈先升后降趋势, 在 1 h 时髓过氧化物酶表达量最高。此外, 0.25 h、0.5 h、1 h、3 h 与 6 h 组与对照组差异性极显著($P<0.01$), 12 h 组与对照组差异性显著($P<0.05$)。48 h 与 96 h 组与对照组差异不显著($P>0.05$)。此外, 空白对照组与对照组的差异显著性为 0.993, 表明投喂全价饲料与口灌方式对实验结果无影响(图 2)。

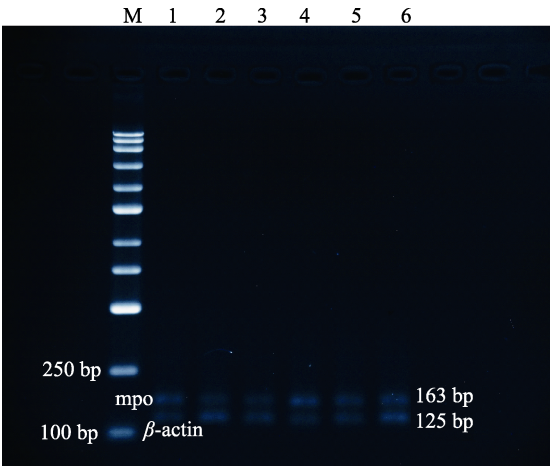


图 1 β -actin 和 MPO 基因 RT-PCR 扩增产物电泳图
M: DNA marker; 泳道 1、3、5 分别是空白对照组 MPO cDNA (163 bp)和 β -actin (125 bp)基因 PCR 扩增产物; 泳道 2、4、6 分别是灌药组 MPO cDNA (163 bp)和 β -actin (125 bp)基因 PCR 扩增产物。

Fig. 1 Gel electrophoresis of the RT-PCR amplification
M: DNA marker; Lanes 1, 3 and 5 are control groups for MPO cDNA (163bp) and β -actin (125 bp), respectively; Lanes 2, 4 and 6 are experimental groups for MPO cDNA (163 bp) and β -actin (125 bp), respectively.

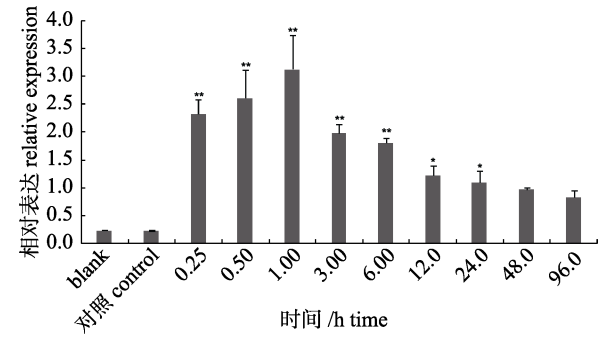


图 2 鲫口灌吡喹酮处理后不同时间 MPO 表达量
“*”表示与对照组相比差异显著($P<0.05$); “***”表示与对照组相比差异极显著($P<0.01$). blank: 空白对照.
Fig. 2 Relative expression at different time after oral administration of praziquantel in *C. auratus*
“*” and “***” means singnificant dufference ($P<0.05$) and extremely singnificant difference ($P<0.01$), respectively, compared with the control group.

2.3 血样中吡喹酮残留量测定结果

本研究利用高效液相色谱仪测定血液中吡喹酮含量, 吡喹酮药物峰分离良好, 色谱图基线走动平稳, 重现性较好, 保留时间为 6 min。吡喹酮的标准溶液在 0.05~20.00 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内线性关系良好, 标准曲线方程为 $y=0.4475x+0.0079$, $R^2=0.999$ 。0.05 $\mu\text{g/mL}$ 为本实验最低检测限, 吡喹酮在血液中的回收率为 87.2%~89.8%。测得日内和日间相对标准偏差不大于 6.93%和 7.32%, 皆不大于 10%, 符合检测要求。吡喹酮在血液中的药时数据符合二室开放模型, 药代动力学方程为: $C_t=19.79e^{-0.974t}+1.698e^{-0.065t}-21.409e^{-1.206t}$ 。鲫鱼单次口灌吡喹酮后, 利用高效液相色谱法测定不同时间点血液样品中吡喹酮的浓度, 其药时曲线见图 3。在 1 h 时, 血液中吡喹酮的浓度达峰, 为 2.85 $\mu\text{g/mL}$,

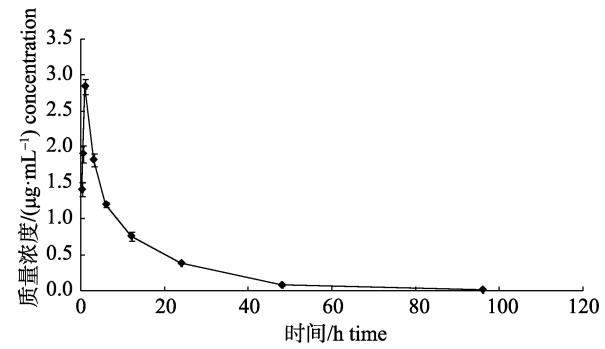


图 3 鲫口灌处理后吡喹酮在血液中的药时曲线
Fig. 3 Praziquantel level in blood after oral administration

96 h 后血液中吡喹酮浓度低于检测限。主要药动学参数见表 3。

表 3 鲫单次口灌吡喹酮后血液中药代动力学参数
Tab. 3 Pharmacokinetic parameters of praziquantel in blood from *C. auratus* after a single oral

药代动力学参数 pharmacokinetic parameter	数值 number	单位 unit
$C_{\max}$	2.71	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
$T_{\max}$	1	h
$t_{1/2\alpha}$	0.711	h
$t_{1/2\beta}$	10.583	h
$t_{1/2K_a}$	0.575	h
V_1/F	1.849	$\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$
CL/F	0.324	$\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$
$AUC_{(0-t)}$	30.684	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$
$AUC_{(0-\infty)}$	30.909	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$
K_{10}	0.175	h^{-1}
K_{12}	0.53	h^{-1}
K_{21}	0.335	h^{-1}
K_a	1.206	h^{-1}

注: $C_{\max}$: 药峰浓度; $T_{\max}$: 药物达峰时间; $t_{1/2\alpha}$: 分布半衰期; $t_{1/2\beta}$: 消除半衰期; $t_{1/2K_a}$: 吸收半衰期; V_1/F : 中央室的分布容积; CL/F : 总体清除率; $AUC_{(0-t)}$: 0~ t 的药时曲线下面积; $AUC_{(0-\infty)}$: 0~ ∞ 的药时曲线下面积; K_{10} : 中央室的消除速率常数; K_{12} , K_{21} : 中央和外周室之间的药物分布的一级速率常数; K_a : 吸收速率常数。
Note: $C_{\max}$: the peak concentration in plasma; $T_{\max}$: the time point of the drug's maximum plasma concentration; $t_{1/2\alpha}$: distribution half-life of the drug; $t_{1/2\beta}$: elimination half-life of the drug; $t_{1/2K_a}$: absorption half-life of the drug; V_1/F : extensive apparent volume of the central compartment; CL/F : total body clearance of the drug; $AUC_{(0-t)}$: area under the concentration–time curve from 0 h to t ; $AUC_{(0-\infty)}$: area under the concentration–time curve from 0~ ∞ ; K_{10} : elimination rate constant from the central compartment; K_{12} , K_{21} : first-order rate constants for drug distribution between the central and peripheral compartments; K_a : absorption rate constant.

2.4 髓过氧化物酶(MPO) mRNA 相对表达量与血药浓度相关性分析结果

通过 SPSS 13.0 统计软件将吡喹酮代谢过程特征时间点的血药浓度与相应时间的 MPO mRNA 相对表达量进行相关性分析, 结果显示, 皮尔森相关系数 $r=0.967$, 为高度线性相关(图 4)。

3 讨论

研究发现, 很多外界因素刺激会导致机体内 MPO 水平增长^[13]。朱玉娇等^[14]为了研究铅及其化合物对草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)血清的抗氧化能力的影响, 分别用不同浓度的 Pb^{2+} 溶液

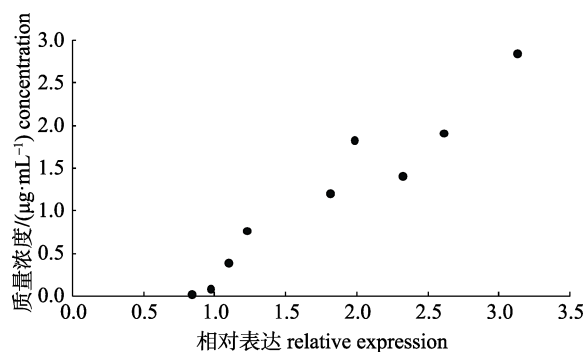


图 4 鲫血药浓度与对应的 MPO 相对表达量相关性分析
Fig. 4 Correlation analysis of blood concentration and relative expression of MPO in *C. auratus*

处理草鱼, 发现在 0.01 mmol/L Pb^{2+} 作用下, MPO 的水平普遍增高; 李桂峰等^[15]在胡子鲇(*Clarias fuscus*)的基础饲料中添加一定量的维生素 C (VC), 实验结果表明, 维生素 C 对胡子鲇血清中的 MPO 水平有促进作用, 在试验前期, 各实验组 MPO 水平均高于对照组, 而在后期这种作用逐渐减弱。以上结论亦与本研究结果相似: 口灌吡啶酮 1 h 后, 鲫鱼的血液中 MPO 表达水平均明显升高并且出现峰值, 随后逐渐下降, 恢复至初始水平并趋向稳定。

Rogstad 等^[16]以单剂量 10 mg/kg 的吡啶酮对虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)进行灌胃, 实验结果显示, 第 7 小时血药浓度达到峰值, 48 h 以后血液中检测不到吡啶酮; Kim 等^[17]对石斑鱼(*Epinephelus*)口灌 400 mg/kg 的吡啶酮, 9 h 血药浓度达到峰值, 而后迅速减少; 谢欣燕等^[18]以 500 mg/kg 的剂量对草鱼灌服吡啶酮预混剂(2%), 结果显示, 在不同盐度水中, 草鱼血药浓度都是在 1 h 内达到峰值, 并在达到峰值后迅速减少。以上结果均与本研究结果相类似: 以 10 mg/kg 剂量口灌 1 h 后, 鲫血药浓度达到峰值, C_{max} 为 2.85 $\mu\text{g/mL}$, 而后迅速下降, 在 96 h 后血液中检测不到吡啶酮。说明吡啶酮在鲫鱼体内吸收迅速, 消除较快。

将吡啶酮代谢过程特征时间点的血药浓度与相应时间的 MPO mRNA 相对表达量进行相关性分析, 结果显示, 皮尔森相关系数 $r=0.967$, 为高度线性相关。药物代谢通常发生在肝等器官内, 一般由药物代谢酶 CYP450 通过氧化、羟基化等反应代谢。然而, 药物代谢也可能发生在其他器

官, 并且被其他酶类催化^[19]。中性粒细胞和单核细胞可以代谢一些药物, 特别是当这种药物处于低氧环境并且药物结构中有硫或者氮时^[20]。中性粒细胞和单核细胞中发生呼吸爆发时, 还原型辅酶 II (NADPH) 催化氧生成超氧化物, 并最终转化成过氧化氢^[21-22], 过氧化氢将 MPO 氧化成复合物 I (Compound I), 不仅复合物 I 自身具有代谢药物的作用, 并且它氧化生成的次氯酸(HClO)也是将药物氧化代谢的主要功能物质。例如, 苯进入机体后, 先是经过一系列催化反应被 CYP2E1 催化生成苯的双羟基或者三羟基化合物, 然后又被 MPO 催化形成苯醌, 接着被还原酶 NQO1 还原成为一种具有微量毒性的多羟基苯, 最终经过 II 相代谢反应后排出体外^[23-24]。又如, Vesnarinone 是一种喹啉酮衍生物, 它在肾中的代谢速度很慢^[25], 但是很容易被白细胞代谢成为反应性代谢物, 它先是在 MPO- H_2O_2 -chloride 系统作用下被氯化, 接着结构上失去一个 HCl, 继而被氧化成最终代谢产物^[26]。吡啶酮作为一种含 N 的异喹啉吡啶衍生物, 与 Vesnarinone 有着极为相似的分子结构, 联系本研究结果“吡啶酮代谢过程特征时间点的血药浓度与相应时间的血 MPO mRNA 相对表达量线性相关”, 可以推断吡啶酮可能是在白细胞内被 MPO 氧化代谢。

综上所述, 可以得出结论: (1) MPO mRNA 相对表达量的升高与外源性药物吡啶酮的摄入有关。其原因可能是吡啶酮进入血液后, 作为外源性刺激使血液中白细胞分泌大量的 MPO。(2) 血液中吡啶酮的残留量与 MPO mRNA 相对表达量线性相关。其原因可能是 MPO 参与了吡啶酮的氧化代谢。当鱼体摄入吡啶酮后, 引起细胞呼吸爆发, 激发 MPO 的活性, 并且生成次氯酸等强氧化性物质, 催化吡啶酮代谢, 随着代谢过程的进行, 两者含量同步下降, 而具体作用过程, 需要进一步研究论证。

参考文献:

- [1] O'Brien P J. Peroxidases[J]. Chem-Biol Interact, 2000, 129 (s1-2): 113-139.
- [2] Han L L, Shen X L. Study progress of myeloperoxidase and its gene polymorphism[J]. Medical Recapitulate, 2007, 13

- (17): 1288–1290. [韩莉莉, 沈晓丽. 髓过氧化物酶及其基因多态性的研究进展[J]. 医学综述, 2007, 13(17): 1288–1290.]
- [3] You Q D. Medicinal Chemistry[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2015. [尤启冬. 药物化学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015.]
- [4] Huang C, Ma L, Li D J. Association between myeloperoxidase G-463A polymorphism and lung cancer risk[J]. Tumor Biol, 2014, 35(1): 475–481.
- [5] Pawlus J, Holub M, Kozuch M, et al. Serum myeloperoxidase levels and platelet activation parameters as diagnostic and prognostic markers in the course of coronary disease[J]. Biosystems, 2010, 32(3): 320–328.
- [6] Reynolds W F, Sermet-Gaudelus I, Gausson V, et al. Myeloperoxidase promoter polymorphism-463G is associated with more severe clinical expression of cystic fibrosis pulmonary disease[J]. Mediat Inflamm, 2006: 36735.
- [7] Kim K H, Cho J B. Treatment of *Microcotyle sebastis* (Monogenea: Polyopisthocotylea) infestation with praziquantel in an experimental cage simulating commercial rockfish *Sebastes schlegeli* culture conditions[J]. Dis Aquat Organ, 2000, 40: 229–231.
- [8] Stephens F J, Cleary J J, Jenkins G, et al. Treatments to control *Haliootrema abaddon* in the West Australian dhufish, *Glaucosoma hebraicum*[J]. Aquaculture, 2003, 215(1–4): 1–10.
- [9] Sharp N J, Diggles B K, Poortenaar C W, et al. Efficacy of Aquic-S, formalin and praziquantel against the monogeneans, *Bebedenia seriola* and *Zeuxapta seriola*, infecting yellow-tail kingfish *Seriola lalandi lalandi* in New Zealand[J]. Aquaculture, 2004, 236(1–4): 67–83.
- [10] Hirazawa N, Mitsuboshi T, Hirata T, et al. Susceptibility of spotted halibut *Verasper variegatus* (Pleuronectidae) to infection by the monogenean *Neobenedenia girellae* (Capsalidae) and oral therapy trials using praziquantel[J]. Aquaculture, 2004, 238(1–4): 83–95.
- [11] Hirazawa N, Akiyama K, Umeda N. Differences in sensitivity to the anthelmintic praziquantel by the skin-parasitic monogeneans *Benedenia seriola* and *Neobenedenia girellae*[J]. Aquaculture, 2013, 404–405: 59–64.
- [12] General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. GB 14925–2010. Laboratory animal environment and facilities[S]. Beijing: Standards Press of China, 2011. [中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB 14925–2010. 实验动物环境及设施[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.]
- [13] Guo C M, Zhang N S, Zhou C F, et al. Development of the myeloperoxidase detecting bovine latent mastitis[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2006, 27(6): 54–57. [郭昌明, 张乃生, 周昌芳, 等. 髓过氧化物酶检测奶牛隐性乳房炎研究进展[J]. 动物医学进展, 2006, 27(6): 54–57.]
- [14] Zhu Y J, Liu Y, Hu C Y. Effect of Pb^{2+} on catalase and myeloperoxidase in serum of *Cenopharyngodon idellus* (grass carp)[J]. Journal of Nanchang University: Natural Science, 2012, 36(2): 176–179. [朱玉娇, 刘永, 胡成钰. Pb^{2+} 胁迫对草鱼过氧化氢酶和髓过氧化物酶的影响[J]. 南昌大学学报: 理科版, 2012, 36(2): 176–179.]
- [15] Li G F, Qian P F, Sun J J, et al. Effects of vitamin C on enzymes activities related to immunity in *Claris batrachus* serum[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2004, 19(4): 301–305. [李桂峰, 钱沛锋, 孙际佳, 等. 维生素C对胡子鲶血清免疫相关酶活性的影响[J]. 大连水产学院学报, 2004, 19(4): 301–305.]
- [16] Rogstad A, Hormazabal V, Yndestad M. Extraction of praziquantel from fish tissue and its determination by high-performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr, 1987, 391(1): 328–333.
- [17] Kim K H, Kim C S, Kim J W. Depletion of praziquantel in plasma and muscle tissue of cultured rockfish *Sebastes schlegeli* after oral and bath treatment[J]. Dis Aquat Organ, 2001, 45(3): 203–207.
- [18] Xie X Y, Zhao Y N, Yang X L, et al. Effect of salinity on tissue absorption and elimination of praziquantel premix in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2015, 34(4): 102–107. [谢欣燕, 赵依妮, 杨先乐, 等. 盐度对吡喹酮预混剂在草鱼体内吸收及其残留消除规律的影响[J]. 华中农业大学学报, 2015, 34(4): 102–107.]
- [19] Anders M W. Bioactivation of foreign compounds[M]. Orlando: Academic Press, 1985.
- [20] Winterbourn C C. Comparative reactivities of various biological compounds with myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride, and similarity of oxidant to hypochlorite[J]. Biochim Biophys Acta, 1985, 840(2): 204–210.
- [21] Klebanoff S J, Clark R A. The neutrophil: function and clinical disorders[J]. J Med Genet, 1980, 17(2): 160.
- [22] Weiss S J. Tissue destruction by neutrophils[J]. New Engl J Med, 1989, 320: 365–376.
- [23] Ross D. Metabolic basis of benzene toxicity[J]. Eur J Haematol, 1996, 57(s60): 111–118.
- [24] Snyder R, Hedli C C. An overview of benzene metabolism[J]. Environ Health Perspect, 1996, 104 (Suppl 6): 1165–1171.
- [25] Miyamoto G, Sasabe H, Tominaga N, et al. Metabolism of a

new positive inotropic agent, 3,4-dihydro-6-[4-(3,4-dimethoxybenzoyl)-1-piperazinyl]-2(1H)-quinolinone (OPC-8212) in the rat, mouse, dog, monkey and human[J]. *Xenobiotica*,

1988, 18(10): 1143–1155.

[26] Uetrecht J P. Metabolism of drugs by leukocytes[J]. *Drug Metabol Drug Interact*, 1994, 11(4): 259–282.

Correlation of the relative expression of myeloperoxidase and praziquantel concentration in blood of the crucian carp, *Carassius auratus*

LIU Tengfei^{1,2}, MA Rongrong^{1,3}, XIAO Yanyi¹, ZHU Fengjiao¹, YANG Xianle¹, HU Kun¹

1. National Pathogen Collection Center for Aquatic Animals, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Bureau of Agriculture, Forestry and Animal Husbandry of Gaocheng District, Shijiazhuang 052160, China;

3. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China

Abstract: The leukocyte enzyme myeloperoxidase (MPO) is widely present in animals, and is involved in various physiological responses in vivo. When the body is stimulated and the stress reaction is produced, MPO content increases rapidly, showing strong oxidation activity and destruction of invading microorganisms, and enhancing immunity. The strong oxidizing property of MPO has an immense influence on the oxidative metabolism of drugs. Praziquantel (PZQ) is a quinoline pyrazine derivative, and widely used in aquaculture as an anti-parasite drug. In this experiment, PZQ was used as a model drug and crucian carp as a model organism. Analysis of the relationship between MPO mRNA expression and concentration of PZQ in the crucian carp was made after single-dose oral administration of PZQ in an attempt to establish a method for the evaluation of fish in vivo drug residues with MPO genetic. In this study, blood samples were collected at 0.25 h, 0.5 h, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h and 96 h after oral administration of 10 mg/kg PZQ, and PZQ concentrations of the samples were simultaneously detected using high-performance liquid chromatography. Pharmacokinetic analysis was performed using the DAS 3.0 program. Pharmacokinetic parameters were based on classical compartmental model analysis. PZQ can be absorbed quickly into the blood and eliminated rapidly. Concentration and time data of PZQ in the blood can best be described by a two-compartmental open pharmacokinetic model; the pharmacokinetics equation was $C_t = 19.79e^{-0.974t} + 1.698e^{-0.065t} - 21.409e^{-1.206t}$. The peak concentration of PZQ was 2.85 $\mu\text{g/mL}$ in the first hour and it was below the detection limit after 96 h. The relative expression of MPO was explored for the first time, using real-time fluorescent quantitative PCR (RT-PCR) with the reference gene of β -actin. The peak value in the relative expression of MPO mRNA also appeared in the first hour. At 0.25, 0.5, 1, 3 and 6 h the relative expression of MPO mRNA showed an extremely significant difference compared with the control group ($P < 0.01$). At 12 h and 48 h the difference was significant ($P < 0.05$), then gradually decreased to a relatively low value (no significant difference) with the control group at 48 h. In addition, the difference between the control group and the blank control group was 0.993, which showed that the full price feed and the mouth irrigation method had no effect on the experimental results. Correlation analysis indicated that the correlation coefficient of the MPO mRNA relative expression amount and PZQ concentration in blood was highly correlated ($r = 0.96$). This suggests that MPO may participate in the oxidative metabolism of PZQ. This study provides a new approach to the molecular evaluation of drug residues in aquatic animals, and a theoretical basis for the safe use of drugs in aquaculture.

Key words: *Carassius auratus*; myeloperoxidase; praziquantel; real-time fluorescent quantitative PCR (RT-PCR); blood drug concentration; metabolism

Corresponding author: HU Kun. E-mail: khu@shou.edu.cn