

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2013.00411

基于 P-糖蛋白基因表达评价尼罗罗非鱼体内恩诺沙星代谢 “首过效应”

胡鲲¹, 程钢², 吕利群¹, 章海鑫¹, 王会聪¹, 阮记明¹, 陈力¹,
房文红³, 杨先乐¹

1. 上海海洋大学 国家水生动物病原库, 上海 201306;
2. 中南民族学院, 湖北, 武汉 430074;
3. 中国水产科学研究院 东海水产研究所, 上海 200090

摘要: 为从药物酶的角度建立一种客观评价鱼类“首过效应”的方法, 利用荧光定量 PCR 法测定尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus* Linn) 肝、肾组织中 P-糖蛋白(*P-gp*)基因表达量, 分析了单剂量(40 mg·kg⁻¹)口服给药恩诺沙星(enrofloxacin, ENR)后, 尼罗罗非鱼肠道、肝组织中 mRNA 水平的相对表达量与 ENR 血药浓度的实时相关性。实验结果显示: 在尼罗罗非鱼肠道、肝组织中, *P-gp* 基因在分子量 127 bp 处出现了与预期大小相符的特异性扩增片段。对尼罗罗非鱼口服给药 ENR 后, ENR 能迅速通过肠道进入血浆, 其在肠道、肝和血浆中的消除速度较快, 其药物时量曲线关系符合一级吸收的二室开放动力学模型。当血浆中 ENR 浓度达到最高达峰时(1 h), 实验组肠道和肝中 *P-gp* 基因的相对表达量相对于对照组均表现出显著性差异($P < 0.05$); 当肠道中 ENR 浓度达到最高峰时(2 h), 实验组肠道 *P-gp* 基因的相对表达量则表现出极显著差异($P < 0.01$); 当肝中 ENR 浓度达到最高峰时(2 h), 实验组肝 *P-gp* 基因的相对表达量与对照组相比则表现出显著性差异($P < 0.05$)。该结果证实了鱼类 *P-gp* 基因参与药物代谢过程, 提供了一种从分子水平揭示水产动物体内药物代谢规律的思路。

关键词: P-糖蛋白; 尼罗罗非鱼; 恩诺沙星; 首过效应; 药物代谢

中图分类号: S949

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2013)02-0411-08

药物在动物体内的代谢过程中, 存在着首过效应(first-pass effect)^[1]: 药物通过肠道、肝等器官时被部分分解或外排, 致使进入血液中的药量减少(血药浓度降低), 分布到各个靶组织的药物剂量随之减少, 药效减低。首过效应具有剂量依赖性。在制定药物安全使用技术规范时, 往往由于忽略了首过效应等因素, 导致实践生产中药效不能达到预期效果($C_{\max}/MIC$ 保持适当的倍数)。其后果是药物往往被过量使用, 威胁水产品质量安

全。建立恰当的方法评价药物在水产动物体内的“首过效应”可为药物安全使用技术的制定提供依据, 对控制水产养殖品中药物残留风险具有较大的现实意义。

P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)是一种广泛地存在于动物肝肾、肠道等组织器官中的跨膜糖蛋白^[2-4], 也被证实存在于鱼类中^[5-6]等动物组织中。P-gp 是一种典型的药物外排泵, 具有介导药物外排的功能。由于 P-gp 的对药物的外排作用,

收稿日期: 2012-07-30; 修订日期: 2012-10-05.

基金项目: 国家 863 计划项目(2011AA10A216); 公益性农业行业专项项目(201203085); 现代农业产业技术体系(CARS-46-12)和农业部海洋与河口渔业资源及生态重点开放实验室开放基金课题(开-09-06); 国家科技基础条件平台项目; 上海海洋大学博士科研启动基金资助项目(A-2400-12-0000341).

作者简介: 胡鲲(1976-), 男, 博士, 副教授, 主要从事水产品安全方面的研究. E-mail: khu@shou.edu.cn

通信作者: 杨先乐, 教授, 从事水产动物医学研究. E-mail: xlyang@shou.edu.cn

其表达是否与药物在水产动物肝、肠道等组织中的首过效应具有某种联系, 成为一个令人关注的问题。以往关于水产动物体内 *P-gp* 的研究大都集中于监测环境污染物方面^[8-10], 尚未见将鱼类组织中 *P-gp* 与其药物代谢过程相联系的研究报道。

本研究以恩诺沙星(enrofloxacin, ENR)为模式药物, 分析了尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus* Linn)肠道、肝组织中 *P-gp* 基因在 mRNA 水平的表达, 评价了其相对表达量与 ENR 浓度的相关性, 尝试建立一种利用 *P-gp* 基因评价水产动物体内首过效应的方法, 为完善水产养殖品安全用药技术提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 仪器设备

Agilent-1100 型高效液相色谱仪, 配荧光检测器; Heidolph 4000 型旋转蒸发仪; KINEMTICAAG 型高速组织捣碎机; HitachiCR21G 型冷冻高速离心机; BIO-RAD iQ5 Real-time PCR 仪, BECKMEN DU800 型紫外分光光度计; IKA-C-MAG MS7 型振荡器。

1.2 试剂与耗材

ENR 标准品(含量 $\geq 99\%$)购自 Sigma 公司。总 RNA 提取试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司。反转录试剂盒(ReverTra Ace- α -TM)和荧光定量试剂盒(SYBR Green Realtime PCR Master Mix QPK-201)购自 TOYOBO 公司。乙腈为色谱级。无水硫酸钠、盐酸、正己烷四丁基溴化铵为化学纯, 购自上海安谱科学仪器有限公司。

1.3 动物饲养、给药及取样

尼罗罗非鱼购于江苏省南通农场, 健康无病, 未用过任何药物。鱼体质量(50 ± 10.4) g。实验前于 $4 \text{ m} \times 2 \text{ m} \times 1 \text{ m}$ 的网箱中暂养 7 d, 并在给药前 3 d 停止投饲。以 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量, 用套有橡皮软管的注射器对尼罗罗非鱼口灌 ENR。给药后尼罗罗非鱼在 25°C 水温下饲养。在给药后不同时间点随机取实验尼罗罗非鱼 3 组, 每组 5 尾。采取血浆、肠道和肝脏组织, 放入 -80°C 超低温冰箱保存备用。设立未给药的尼罗罗非鱼 3 组(每组 5 尾)

为空白对照。所以实验用鱼的处置均遵循《实验动物环境及设施》^[7]。

1.4 利用 *P-gp* mRNA 水平的表达分析首过效应

1.4.1 *P-gp* 基因的表达分析

(1) 通过 PCR 扩增克隆尼罗罗非鱼 *P-gp* 基因的 cDNA

采用 Trizol 试剂盒提取尼罗罗非鱼组织总 RNA。利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检查纯化后的 RNA 质量。使用 Rerver Tra Ace- α -TM 试剂盒将 RNA 反转录得到 cDNA。

选取 β -actin 基因作为内参基因。 β -actin 和 *P-gp* 的引物利用 Primer Premier 5.0 软件进行设计。引物序列如下:

β -actin

Forward primer: CCTCACCTCAAGTACCC
CAT

Reverse primer: TTGGCCTTTGGGTTGAGTG

P-gp

Forward primer: CACCTGGACGTTACCAAAG
AAGATATA

Reverse primer: TCACCAACCAGCGTCTCAT
ATTT

PCR 反应步骤为: 94°C 3 min; 94°C 30 s、 $N^\circ\text{C}$ (β -actin 基因和 *P-gp* 基因分别为 49.6°C 和 51.5°C)30 s、 72°C 30 s, 35 个循环; 72°C 10 min。利用电泳检测 PCR 产物。采取 Midi Purification Kit 回收经琼脂糖凝胶电泳分离的 PCR 产物。

(2) *P-gp* 基因的实时 PCR 分析

称取 100 mg 动物组织提取 RNA, 按照 1.4.1 的方法合成 cDNA。以 β -actin 做内参基因, 对样品进行 real-time PCR 扩增。定量反应体系组成如下: cDNA 样品 $0.4 \mu\text{L}$ 、SYBR[®] Green PCR Master Mix $5 \mu\text{L}$ 、Primer R($10 \mu\text{mol/L}$) $5 \mu\text{L}$ 和 Primer F($10 \mu\text{mol/L}$) $0.2 \mu\text{L}$ 。PCR 反应结束后设置 $57 \sim 99^\circ\text{C}$ 的熔解温度, 并每隔 1°C 采集 1 次信号。每 1 个反应重复 3 次。所有的统计数据由 *P-gp* 基因与 β -actin 基因表达量的比值得到。

1.4.2 组织中 ENR 及其代谢产物 CIP 残留量的分析 利用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)分析不同给药时间点的组织中 ENR 的浓度。样品用 6 倍体积的乙腈振荡提

取, 4 500 r/min 离心 5 min, 取上清。对残渣重复提取一次, 并合并上清。上清液与正己烷混合, 充分振荡, 静置, 弃水相。将有机相在旋转蒸发器中蒸发至干, 流动相溶解残渣并经微孔滤膜过滤后上 HPLC。色谱条件: 反相 C_{18} 柱色谱柱(4.6 mm×150 mm); 流动相为甲醇/柠檬酸-醋酸铵混合盐溶液=25/75(mL/mL); 流速 1.5 mL/min; 激发波长: 280 nm, 发射波长 450 nm; 柱温 40 ; 进样量 10 μ L。将 ENR、CIP 标准品配制成梯度浓度的标准溶液。以浓度(μ g/mL)为横坐标, 药物峰面积为纵坐标绘制标准曲线。利用外标法测定药物浓度。

1.5 ENR 代谢过程中 *P-gp* 基因的表达分析

分析 ENR 代谢过程中的特征性时间点肠道、肝脏中 *P-gp* 基因的在 mRNA 水平的相对表达量。

1.6 数据处理

根据血药浓度-时间的半对数关系初步确定药物的处置过程模型。使用 DAS 3.0 药代动力学软件对药动学模型进行拟合并计算相关参数。实验数据由 SPSS 16.0 统计软件进行处理和分析。对实验组与对照组的测定结果进行显著性分析, $P < 0.05$ 认定为两者具有显著性差异, $P < 0.01$ 认定为两者具有极显著差异。

2 结果与分析

2.1 尼罗罗非鱼肠道组织中 *P-gp* 基因表达分析

对于提取的 RNA 样品, 经紫外分析 OD_{260}/OD_{280} 值在 1.90 ~ 1.95, 表明总 RAN 样品完整性较好, 没有降解, 可以作为反转录模板。总 RNA 经反转录为 cDNA 第一链后, 以其为模板进行 RT-PCR 对肠道组织中的 β -actin 和 *P-gp* 进行扩增。PCR 产物经 1.0% 琼脂凝胶电泳, 结果如图 1。未给药的对照组和给药 ENR(40 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 的实验组肠道、肝脏组织中均能检测出 *P-gp* 基因的表达。*P-gp* 基因在 127 bp 处出现了与预期大小相符的特异性扩增片段。

2.2 血浆中 ENR 代谢过程分析

利用本研究中 HPLC 法测定 ENR, ENR 药物峰分离良好, 基线平稳, 其保留时间分别为 6.38 min。在标准品 0.2 ~ 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的浓度范围内 ENR 的标准曲线分别为 $y = 5.524x - 0.135$, $R^2 = 0.998$ 。利用外标法检测尼罗罗非鱼肠道、肝和血浆中的 ENR 最低检测限可达 5 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 平均回收率为 70.0%~80.5%, 相对标准偏差分别为 1.2%~7.9%。

25℃ 水温条件下, 尼罗罗非鱼单次口灌 ENR 药液后, 利用 HPLC 法测定不同时间点血浆中 ENR 残留量, ENR 在肠道、肝和血液中的代谢

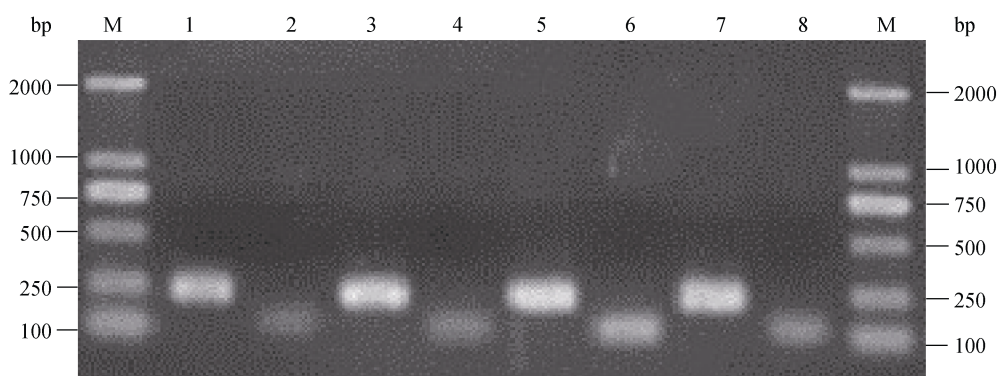


图 1 β -actin 和 *P-gp* 基因 RT-PCR 扩增产物电泳图

M: DNA Marker; 泳道 1、3、5、7 分别为空白对照组肠道、给药实验组肠道、空白对照组肝脏和给药实验组肝组织中 β -actin 基因 PCR 扩增产物; 泳道 2、4、6、8 分别为空白对照组肠道、给药实验组肠道、空白对照组肝和给药实验组肝组织中 *P-gp* 基因 PCR 扩增产物。

Fig.1 Gel electrophoresis of the RT-PCR amplification

M: DNA Marker. Lanes 1 and 5 were the control group of the intestinal and liver tissues for β -actin respectively. Lanes 3 and 7 were the experimental group of the intestinal and liver tissues for β -actin respectively. Lanes 2 and 6 were the control group of the intestinal and liver tissues for *P-gp* respectively. Lanes 4 and 8 were the control group of the intestinal and liver tissues for *P-gp* respectively.

规律见图 2。ENR 在血液中的最大达峰时间最早, 为 1 h; 肠道、肝的达峰时间均为 2 h。ENR 在肠道中最大达峰浓度最高, 达 $34.98\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$; 在肝和血浆中的最大达峰浓度分别为 $4.84\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 $3.47\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。应用 DAS 软件分析药物水平-时间关系进行二室模型数据拟合, ENR 在肠道、肝和血液

中药物时量曲线方程分别为: $C=227.34\times e^{-0.54t}+185.73e^{-0.33t}-43.79e^{-0.77t}$ 、 $C=28.31\times e^{-0.90(t-0.07)}+2.27e^{-0.03(t-0.07)}-32e^{-1.22(t-0.07)}$ 和 $C=4.66\times e^{-0.81t}+1.55e^{-0.07t}-151.13e^{-7.54t}$; 拟合度(R^2)分别为 0.948、0.966 和 0.979。利用房室模型推算所得的 ENR 在血浆中主要药动学参数见表 1。

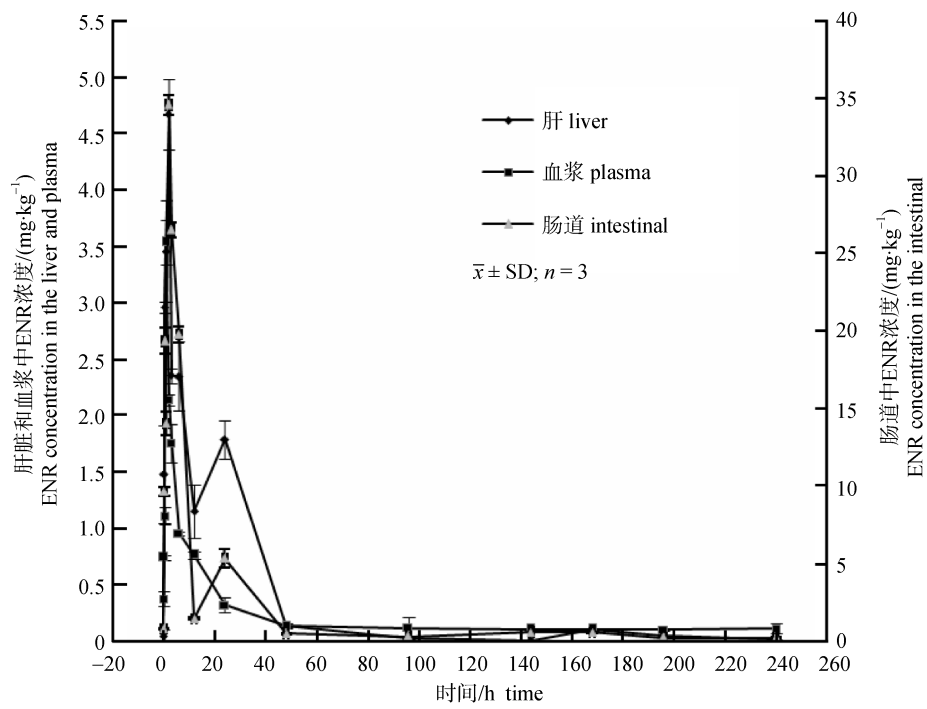


图 2 ENR 在尼罗罗非鱼肝、血浆和肠道组织中的代谢的过程
ENR 浓度为 HPLC 方法的实测值。

Fig. 2 Pharmacokinetic of ENR after a single oral administration in intestinal, liver and plasma of *Oreochomis niloticus* Linn
The concentration of ENR were assayed by HPLC method.

表 1 ENR(口服剂量 $40\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 在尼罗罗非鱼组织中药物代谢的主要参数

Tab.1 Main pharmacokinetic parameters of ENR after a single oral administration ($40\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) to *Oreochomis niloticus* Linn
 $\bar{x}\pm\text{SD}$; $n=3$

代谢参数 pharmacokinetic parameters	肠道 intestinal	肝 liver	血浆 plasma
$C_{\max}/(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}, \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	34.98	4.84	3.47
$T_{\max}/\text{h}$	2	2	1
$t_{1/2\alpha}/\text{h}$	1.277	0.773	0.854
$t_{1/2\beta}/\text{h}$	2.124	21.19	10.328
$V_1/(\text{L}\cdot\text{kg}^{-1})$	229.459	4371.67	7024.08
$\text{CL}_s/(\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1})$	178.044	506.231	1447.51
$\text{AUC}_{0-240}/(\mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1})$	224.657	78.987	27.631
$\text{AUC}_{0-\infty}/(\mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1})$	224.664	79.015	27.634

注: $C_{\max}$: 最大浓度; $T_{\max}$: 出峰时间; V_1 : 中央室表观容积; AUC: 血药浓度时间曲线下面积; $t_{1/2\alpha}$: 吸收半衰期; $t_{1/2\beta}$: 消除半衰期; CL_s : 清除率。
Note: V_1 : apparent volume of the central; $C_{\max}$: the maximum concentration; $T_{\max}$: peak time; $t_{1/2\alpha}$: distribution half-life of the drug; $t_{1/2\beta}$: elimination half-life of the drug; AUC: area under the curve; CL_s : total body clearance of the drugs.

2.3 ENR 最大达峰时间尼罗罗非鱼肠道、肝组织中的 *P-gp* 基因表达的差异性分析

利用 PCR 的方法, 在对照组和给药实验组尼罗罗非鱼肠道、肝组织中均检测出 *P-gp* 基因的表达。选取 β -actin 基因为内参基因, 利用荧光定量 PCR 的方法测定 ENR 代谢过程中不同时间点尼罗罗非鱼肠道、肝组织中 *P-gp* 基因相对表达量, 实验结果见图 3。ENR 代谢的初始时间点(0.017 h)和残留消除末期时间点(240 h)的实验组肠道组织中 *P-gp* 基因的相对表达量与对照组无显著性差异。当血浆中 ENR 浓度达到最高达峰时(1 h), 实验组肠道 *P-gp* 基因的相对表达量相对于对照组表现出显著性差异($P<0.05$); 当肠道中 ENR 浓度达到最高峰时(2 h), 实验组肠道 *P-gp* 基因的相对表达量则表现出极显著差异($P<0.01$)。在肝组织中, 在 ENR 代谢的初始时间点(0.017 h)和残留消除末期时间点(240 h) *P-gp* 基因的相对表达量与对照组无显著性差异。在血浆中 ENR 的最大达峰时间(1 h)和肝中 ENR 的最大达峰时间(2 h), 实验组肝 *P-gp* 基因的相对表达量与对照组相比均表现出显著性差异($P<0.05$)。以上结果证明, *P-gp* 在尼罗罗非鱼肠道、肝组织中广泛; 且其在肠道和肝组织中的存在通过对药物的外排作用, 其表达可能会影响尼罗罗非鱼体内“首过效应”, 其在 mRNA 水平的表达可以进一步作为评价“首过效应”提供了参考依据。

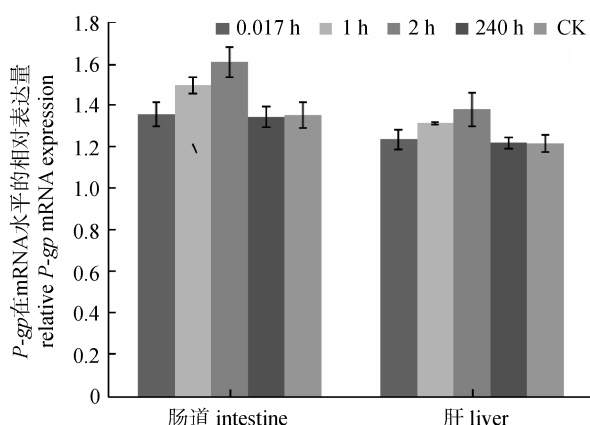


图3 ENR 代谢过程中尼罗罗非鱼肠道、肝组织中的 *P-gp* 基因表达的差异性分析

Fig.3 Quantification of *P-gp* mRNA expression in intestinal and liver tissues

3 讨论

3.1 鱼类组织中 *P-gp* 基因

P-gp 是一种的跨膜糖蛋白, 属于 ATP 结合盒 (ATP-binding cassette, ABC) 转运蛋白超家族成员之一^[3, 11]。马云芳^[12]报道了斑马鱼 (*Danio rerio*) 肠道组织中克隆了 *P-gp* 基因, 获得了其 cDNA 和保守区的氨基酸序列。经同源比较证实: 斑马鱼 P-糖蛋白与人和小鼠的 P-糖蛋白同源性分别为 49.4% 和 49.7%; *P-gp* 基因在软骨鱼纲、硬骨鱼纲等水产动物中的序列保守度可达到 78% 以上。尼罗罗非鱼分类地位上属于硬骨鱼纲, 也是中国出口的重要水产经济养殖动物, 这是本研究选取尼罗罗非鱼作为研究动物的原因。

P-gp 作为一种能量依赖性药物外排泵, 能降低细胞内药物浓度, 并在内源性、外源性药物化合物的排序中起重要作用^[3, 11]。Kleinow^[6]通过检测免疫组化 (immunohistochemistry) 的方法比较了 catfish 肝和肠组织中的 *P-gp* 在 xenobioti 等环境污染吸收和外排过程中的作用。以往一般将水生动物体内 *P-gp* 作为环境污染物的生物标记。*P-gp* 与药物代谢酶 P450 具有相似的功能^[22], 但在调控机制上又不尽相同。在畜牧动物和人体内, *P-gp* 被证明能通过介导药物的外排过程而影响药物的代谢过程, 是决定药物在动物体内生物利用度的重要因素之一^[3, 13-14]。但其对水生动物药物代谢过程影响的报道几乎为空白。本文在给药组和对照组的尼罗罗非鱼肝和肾中均扩增出与预期大小相符的 *P-gp* 特异性片段 (图 1), 证实了 *P-gp* 在尼罗罗非鱼肝和肾组织中的存在, 并为随后分析其在 ENR 代谢过程中的作用提供了方法。

3.2 尼罗罗非鱼肠道、肝中 *P-gp* 的对 ENR 的“首过效应”的关联分析

ENR 等喹诺酮类药物属于典型的浓度依赖性抗菌药, 抗菌谱广, 杀菌作用强。ENR 这类浓度依赖性抗菌药通常具有首过效应^[1]。尽管关于大量的关于 ENR 在水产动物组织中代谢规律的研究报道^[15-21], 但这些研究报道均未从药效学的角度分析水产动物的“首过效应”问题。肠道和

肝是鱼类口服给药后药物首先经过的器官,也是 *P-gp* 的主要分布器官。药物通过肠道和肝后,随血液的体内循环分布到全身各个组织。“首过效应”在很大程度上最终体现为 ENR 在鱼类血浆中浓度的变化。由图 2 和表 1 可知,血浆中药物达峰时间最早(1h),说明口服给药的 ENR 通过肠道、肝进入血浆的速度较快,该结果与张雅斌等^[21]测定的同为鲤科鱼类的鲤的血浆中 ENR 消除规律相似。ENR 口服给药后首先进入尼罗罗非鱼肠道,实验结果显示 ENR 大部分为在其肠道所吸收,肠道中 ENR 的最高残留量可达 $34.98 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 远远高于肝。另一方面,血浆中的 V_1 值高于肠道和肝组织(表 1),说明 ENR 在尼罗罗非鱼血浆中具有较大的分布容积。表 1 中 $t_{1/2\alpha}$ 、 $t_{1/2\beta}$ 和 CL_s 等参数说明 ENR 在尼罗罗非鱼肠道、肝和血浆中的消除速度十分迅速。以上结果证实了 ENR 适于在尼罗罗非鱼养殖过程中作为抗菌药使用而残留的风险很小。

作为药物泵, *P-gp* 的表达能影响动物内药物代谢过程^[22]。本研究选取 ENR 代谢过程中不同的时间点为横坐标,评价了肠道和肝组织中 *P-gp* 表达的差异性。实验结果显示:在 ENR 低残留阶段(代谢的初始阶段和代谢末期),实验组肠道和肝中 *P-gp* 在 mRNA 水平的相对表达量与对照组无显著性差异;而在 ENR 高残留阶段(在血浆、肠道/肝中的最大达峰时间),实验组肠道和肝中 *P-gp* 在 mRNA 水平的相对表达量显著升高,且肠道组织有极显著性差异。

以上结果显示:“*P-gp* 基因的表达与外源性药物 ENR 的摄入及其代谢过程紧密相关”。李静^[23]曾经报道过“环丙沙星(ENR 在动物体内的代谢产物)可能是 *P-gp* 的底物”。出现这种结果的原因可能是由于 ENR 也是一种 *P-gp* 的诱导剂。

ENR 的残留量与 *P-gp* 在 mRNA 水平的相对表达量也存在着相关性。ENR 残留量越高, *P-gp* 的表达量越高, *P-gp* 介导的对于药物的外排作用越强。肠道和肝中 *P-gp* 表达也存在差异:特别是在血浆中 ENR 达到峰值时,肠道中 *P-gp* 的表达显著增强。该结果一方面说明相对于肝,肠道的

“首过效应”可能更大,另一方面,肠道中的 ENR 更高的残留量也可能是引起该现象的原因。以上结果也与前面关于 ENR 在尼罗罗非鱼体组织器官水平消除迅速的结论相符。令人感兴趣的是,在某些特定的代谢时间点, *P-gp* 基因的相对表达量与血药浓度的关联性为从药物酶的角度评价药物“首过效应”提供了一个新的技术方法。

参考文献:

- [1] 刘克辛, 韩国柱. 临床药物代谢动力学[M]. 北京: 科学出版社, 2009.
- [2] Saeki T, Ueda K, Tanigawara Y, et al. Human P-glycoprotein transports cyclosporin A and FK506 [J]. Biol Chem, 1993, 268(9): 6077–6080.
- [3] Vinod Thomas, Kesavan Ramasamy, Rajan Sundaram, et al. Effect of honey on CYP3A4 Enzyme and P-Glycoprotein activity in healthy human volunteers [J]. Iran J Pharmacol Therap, 2007(6): 171–176.
- [4] Hemmer M J, Courtney L A, Ortego L S. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in teleost tissues using mammalian polyclonal and monoclonal antibodies [J]. J Exp Zool, 1995, 272: 69–77.
- [5] Miller D S. Daunomycin secretion by killifish renal proximal tubules [J]. Am J Physiol (Regul Integrat Comp Physiol 38), 1993, 269: 370–379.
- [6] Kleinow K, Doi A, Smith A. Distribution and inducibility of P-glycoprotein in the catfish: immunohistochemical detection using the mammalian C-219 monoclonal [J]. Mar Environ Res, 2000, 50: 313–318.
- [7] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB14925-2001 实验动物环境及设施[S]. 北京: 中国标准出版社, 2001.
- [8] Kurelec B, Pivcevic B. Evidence for a multidrug resistance mechanism in the mussel *Mytilus galloprovincialis* [J]. Aquat Toxicol, 1991, 19: 291–302.
- [9] Toomey B H, Epel D. Multidrug resistance in *Urechis caupo* embryos: protection from environmental toxins [J]. Biol Bull, 1993, 185: 355–364.
- [10] Liu J, Chen H, Miller DS, et al. Overexpression of glutathione S-transferase II and multidrug resistance transport proteins is associated with acquired tolerance to inorganic arsenic [J]. Mol Pharmacol, 2001, 60(2): 302–309.
- [11] Shannon Mala Bard, Woodin R, Stegeman J J. Expression of

- P-glycoprotein and cytochrome P450 1A in intertidal fish (*Anoplarchus purpurascens*) exposed to environmental contaminants [J]. *Aqu Toxicol*, 2002, 60: 17–32.
- [12] 马云芳. 斑马鱼 P-糖蛋白 cDNA 的克隆及表达分析[D]. 重庆: 西南大学, 2008.
- [13] Lown KS, Mayo RR, Leichtman AB, et al. Role of intestinal P-glycoprotein(mdr1) in interpatient variation in the oral bioavailability of cyclosporine [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 1997, 62(3): 248–260.
- [14] Marzolini C, Paus E, Buclin T, Kim RB. Polymorphisms in human MDRI (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2004, 75: 13–33.
- [15] 梁俊平, 李健, 张茹, 等. 肌注和口服恩诺沙星在大菱鲆体内的药代动力学比较[J]. *水生生物学报*, 2010, 34(6): 1122–1129.
- [16] 房文红, 于慧娟, 蔡友琼, 等. 恩诺沙星及其代谢物环丙沙星在欧洲鳗鲡体内的代谢动力学[J]. *中国水产科学*, 2007, 14(4): 622–629.
- [17] 郑宗林, 唐俊, 喻文娟, 等. RP-HPLC 法测定中华绒螯蟹主要组织中的恩诺沙星及其代谢产物[J]. *上海水产大学学报*, 2006, 15(2): 156–162.
- [18] 余开, 陈寅儿, 赵青松, 等. 恩诺沙星在人工感染溶藻弧菌的三疣梭子蟹体内的代谢动力学[J]. *台湾海峡*, 2011, 30(2): 257–263.
- [19] 郭娇娇, 潘红艳, 杨虎, 等. 恩诺沙星在杂交鲟体内的药物代谢动力学[J]. *大连海洋大学学报*, 2011, 26(4): 262–266.
- [20] 余培建. 药浴给药恩诺沙星及其代谢产物在欧洲鳗鲡体内的药代动力学研究[J]. *福建水产*, 2007(4): 38–43.
- [21] 张雅斌, 刘艳辉, 张祚新, 等. 恩诺沙星在鲤体内的药效学及药动力学研究[J]. *大连水产学院学报*, 2004, 19(4): 239–242.
- [22] Hochman JH, Chiba M, Yamazaki M, et al. P-glycoprotein-mediated efflux of indinavir metabolites in Caco-2 cells expressing cytochrome P450 3A4 [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, 298(1): 323–330.
- [23] 李静. P-糖蛋白与药物相互作用模型的建立及其在药物评价中的应用[D]. 北京: 军事医学科学院, 2009.

Association between permeability glycoprotein expression and enrofloxacin metabolism to evaluate the first-pass effect in *Oreochromis niloticus* Linn

HU Kun¹, Cheng Gang², LV Liqun¹, ZHANG Haixin¹, WANG Huicong¹, RUAN Jiming¹, CHEN Li¹, FANG Wenhong³, YANG Xianle¹

1. National Pathogen Collection Center for Aquatic Animals, Shanghai Ocean University, 999 Hucheng Huan Road, Shanghai 201306, China;

2. South-Central College for Nationalities, Wuhan 430074, China;

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

Abstract: A fluorescence quantitative PCR method for detecting the P-glycoprotein gene in *Oreochromis niloticus* Linn was established to evaluate the first-pass effects. After the oral gavage at a dosage of 40 mg·kg⁻¹ for *O. niloticus*, the relative expression quantity of P-glycoprotein in the intestinal and liver tissues was associated with the concentration of enrofloxacin in the plasma. The results showed that P-glycoprotein fragments (127 bp) were successfully amplified in both the intestinal and liver tissues of *O. niloticus* by using specific primers. The concentrations of enrofloxacin were determined by HPLC. Enrofloxacin can be rapidly absorbed in the intestine and infiltrated into the plasma. The concentration versus time in the intestine, liver and plasma of *O. niloticus* were well described by a two-department open model with first-order absorption. The relative expression quantity of P-glycoprotein of both intestinal and liver tissues in the first hour were higher than the control group ($P<0.05$) while that of the intestine in the second hour was significantly higher ($P<0.01$). The relative expression quantity of P-glycoprotein of liver tissues in the second hour were higher than the control group ($P<0.05$). These results suggest that P-glycoprotein may be involved in the enrofloxacin metabolism process in *O. niloticus*, providing a novel model for the potential utility of gene expression and drug metabolism studies in aquatic animals.

Key words: P-glycoprotein; *Oreochromis niloticus* Linn; enrofloxacin; first-pass effect; drug metabolism

Corresponding author: YANG Xianle. E-mail: xlyang@shou.edu.cn