

DOI:10.7524/AJE.1673-5897.20190903001

刘婉玉, Tadiyose Girma Bekele, 赵洪霞. 恩诺沙星在鲫鱼肝微粒体中的代谢及代谢关键酶[J]. 生态毒理学报, 2020, 15(3): 64-70

Liu W Y, Tadiyose G B, Zhao H X. Metabolism of enrofloxacin in liver microsomes of crucian carp (*Carassius auratus*) and its key enzymes *in vitro* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2020, 15(3): 64-70 (in Chinese)

恩诺沙星在鲫鱼肝微粒体中的代谢及代谢关键酶

刘婉玉, Tadiyose Girma Bekele, 赵洪霞*

大连理工大学环境学院, 工业生态和环境工程教育部重点实验室, 大连 116024

收稿日期: 2019-09-03 录用日期: 2019-12-06

摘要: 抗生素因具有抗菌谱广、杀菌性强等特点而被广泛应用于人类医药、畜牧业、农业和水产养殖业。其进入水生生物体内后, 会在药物代谢酶的作用下发生代谢转化, 产生生态毒性。采用鲫鱼肝微粒体体外孵育法, 探究恩诺沙星细胞色素 P450 酶作用下的代谢转化过程, 并通过代谢抑制实验确定关键的代谢酶。结果表明, 恩诺沙星体外代谢过程符合一级动力学方程, 当恩诺沙星暴露浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 其在肝微粒体中的消除速率常数(k)最大为 0.00303 min^{-1} , 半衰期($t_{1/2}$)最短为 228.8 min, 应用高效液相色谱串联质谱(HPLC-MS/MS)技术, 检测到了恩诺沙星脱乙酰基产物和羟基化产物; 代谢抑制实验结果表明, CYP3A4 在恩诺沙星代谢过程中起主要作用, 是恩诺沙星代谢的关键酶。本研究结果为深入了解恩诺沙星在水生生物体内的代谢转化及其生态风险提供了基础数据。

关键词: 恩诺沙星; 鲫鱼; 微粒体; 体外代谢; CYP3A4

文章编号: 1673-5897(2020)3-064-07 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Metabolism of Enrofloxacin in Liver Microsomes of Crucian Carp (*Carassius auratus*) and Its Key Enzymes *in vitro*

Liu Wanyu, Tadiyose Girma Bekele, Zhao Hongxia*

Key Laboratory of Industrial Ecology and Environmental Engineering of Ministry of Education, School of Environmental Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China

Received 3 September 2019 accepted 6 December 2019

Abstract: Enrofloxacin is efficient and broad-spectrum, which makes it widely used in human medicine, animal husbandry, agriculture and aquaculture. Enrofloxacin can be metabolized by drug metabolizing enzymes in aquatic organisms, which will affect its ecological toxicity. In this study, the *in vitro* incubation method of liver microsomes was used to explore the metabolic transformation process of enrofloxacin under the action cytochrome P450 enzyme, and the key metabolic enzymes were determined by metabolic inhibition experiments. The results showed that the metabolic process of enrofloxacin in fish liver microsomes met the first-order kinetic equation, the maximum depuration rate constant (k) of enrofloxacin in the fish liver microsomes was 0.00303 min^{-1} and the minimum half-life ($t_{1/2}$) was 228.8 min in $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of enrofloxacin exposure concentration. High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) was used to identify the metabolites and metabolic pathways

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21677023)

第一作者: 刘婉玉(1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向为污染生态化学, E-mail: wwanai@mail.dlut.edu.cn

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: hxzhao@dlut.edu.cn

of enrofloxacin in liver microsomes. Two major metabolites were found, including the product of deethylation and hydroxylation. Further, this metabolic inhibition study showed that cytochrome P3A4 might be the key enzyme involved in the metabolism of enrofloxacin. Overall, this study provides basic data for further understanding of the biotransformation and ecological risk of enrofloxacin in aquatic organisms.

Keywords: enrofloxacin; *Carassius auratus*; microsomes; *in vitro* metabolism; CYP3A4

恩诺沙星(enrofloxacin, ENR)是第三代人工合成的氟喹诺酮类广谱抗菌药物,具有抗菌谱广、杀菌性强的特点而被大量应用于人类和兽类疾病的预防与治疗^[1]。在实际生产中,不遵守休药期的药物滥用情况十分严重^[2-3]。这不仅会给动物机体造成伤害,更会随着食物链的传递危害人类健康。恩诺沙星进入生物体内后,会在生物体药物代谢酶的作用下发生代谢转化,可能会产生毒性更强的代谢产物,从而影响其生态毒性。细胞色素 P450 酶(CYP450)又被称为多功能氧化酶,是一类广泛分布于生物体内的药物代谢酶,能够参与外源性物质如抗生素、农药和麻醉剂等的生物转化,在污染物的生物转化过程中起着十分关键的作用^[4]。目前,关于恩诺沙星的生物代谢研究大多是关于其在生物体内的消除规律及其在不同组织中的代谢产物识别^[5-8],对于其在水生生物体 CYP450 作用下的代谢转化机制尚不清楚,恩诺沙星代谢的关键酶还未确定,因此,有必要对其在水生生物体 CYP450 酶作用下的代谢转化进行深入研究。本研究采用鲫鱼肝微粒体体外孵育法,探究恩诺沙星在 CYP450 酶的作用下的代谢转化过程及参与其代谢的关键酶,以期评价其生态和健康风险提供基础数据。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 实验动物

实验动物为鲫鱼,购于大连市中山公园花鸟鱼虫市场,个体质量为 240 ~ 300 g。实验前将其暂养 10 d,养殖水为自来水,使用前连续曝气 24 h,水温为(28 ± 1) °C。

1.2 主要试剂

恩诺沙星及环丙沙星标准品(大连美仑生物技术有限公司);乙腈、甲醇、二氯甲烷、酮康唑、双硫仑和二甲基亚砷(色谱纯,美国 Sigma 公司);还原型辅酶 II (NADPH)、三羟甲基氨基甲烷和甘氨酸(分析纯,北京索莱宝科技有限公司);磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氯化钾和氯化钙(分析纯,天津市大茂化学试剂厂);乙二胺四乙酸二钠(分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司)。

1.3 主要仪器设备

高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司, Agilent 1100);高效液相色谱串联三重四级杆质谱仪(美国 Waters 公司, Xevo TQ-S);荧光分光光度计(日本 Hitachi 公司, F4500);冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司, H1750R);紫外分光光度计(上海美谱达仪器有限公司, UV 6100);手持式匀浆机(上海净信实业发展有限公司, F6/10);全温振荡培养箱(天津莱玻特瑞仪器设备有限公司, ZQPW-70)。

1.4 缓冲溶液配制

0.1 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液(PBS):称取 11.18 g KCl、80 g NaCl、32.3 g Na₂HPO₄·12H₂O、4.5 g NaH₂PO₄·2H₂O 和 0.029 g 乙二胺四乙酸二钠(EDTA),用超纯水溶解,浓 HCl 调节 pH 至 7.4,定容至 1 L。

匀浆缓冲液为含 10% (V:V)甘油的 0.1 mol·L⁻¹ PBS 缓冲溶液。保存缓冲液为含 20% (V:V)甘油的 0.1 mol·L⁻¹ PBS 缓冲溶液。0.1 mol·L⁻¹ 的 Tris-HCl 缓冲溶液:称取 12.11 g 三羟甲基氨基甲烷(Tris),用超纯水溶解,浓盐酸调节 pH 至 7.4,定容至 1 L。

1.5 肝微粒体制备

鲫鱼肝微粒体制备参照沈梦楠^[9]的方法。取健康的鲫鱼,置于冰上解剖得到鲫鱼的肝脏组织,用 5 mL 预冷的缓冲溶液反复冲洗 3 次,洗去血红蛋白,用滤纸擦去多余的液体,称重。组织剪碎后按 1:4 (m:V)加入预冷的匀浆缓冲液,用内切式组织匀浆机于冰浴中制成匀浆。将匀浆液转入预冷离心管中,4 °C、10 000 g 离心 30 min,小心取出全部上清液,按 10:1 (V:V)加入 88 mmol·L⁻¹ 的 CaCl₂ 溶液,混匀后,于 4 °C、15 000 g 离心 60 min。弃上清,沉淀即为微粒体组分。将微粒体沉淀取出后加入少许保存缓冲液,保持冰浴环境涡旋振荡 1 min,进行 2 次,充分混匀,分装于冻存管中,置 -80 °C 保存,以备检测用。

1.6 体外孵育实验

恩诺沙星暴露浓度、微粒体蛋白含量和反应温度的设置参照文献[10]。样品组设置 3 个浓度组,恩诺沙星终浓度分别为 1、5 和 10 mg·L⁻¹。样品体

系主要包含 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Tris-HCl 缓冲溶液($\text{pH}=7.4$), $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NADPH, 10 mg 微粒体蛋白和恩诺沙星(1.5 或 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 反应体系总体积为 1 mL 。除样品组外还设置空白对照组, 即不含目标化合物组, 在体外孵育体系中加入 $100 \mu\text{L}$ 超纯水代替恩诺沙星。反应体系于 $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 预孵 5 min 后, 加入 NADPH 以启动反应, 反应温度为 $28 \text{ }^\circ\text{C}$, 分别孵育 $0, 5, 15, 45$ 和 90 min , 加入 2 mL 预冷的二氯甲烷终止反应。所有样品均设置 3 组平行。

1.7 代谢抑制实验

代谢抑制实验中, 选择双硫仑和酮康唑作为抑制剂。样品组抑制剂设置 2 个浓度组, 分别为 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。样品体系主要包含 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Tris-HCl 缓冲溶液($\text{pH} 7.4$), $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NADPH, 10 mg 微粒体蛋白、恩诺沙星(1.5 或 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)和抑制剂($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 或 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 反应体系总体积为 1 mL 。对照组不含抑制剂, 在体外孵育体系中加入 $25 \mu\text{L}$ 二甲基亚砜(DMSO)代替抑制剂。代谢抑制实验中, 首先在反应体系中加入 $25 \mu\text{L}$ 抑制剂和 NADPH, $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 预孵 5 min 后加入恩诺沙星, 反应体系 $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 90 min 后, 加入 2 mL 预冷的二氯甲烷终止反应。所有样品均设置 3 组平行。

1.8 样品前处理

将终止反应的体外孵育样品置于涡旋混合器振荡混合 1 min , 于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min , 取二氯甲烷有机相, 移入氮吹管中, 剩余残渣加入 1 mL 的二氯甲烷, 再次涡旋混合后离心。重复 2 次后, 合并有机相, 在 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 氮气流下吹干, 以 1 mL 超纯水定容, 过 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜后, 检测分析。

1.9 酶活性测定方法

1.9.1 苯胺 4-羟化酶(AH)活性测定

AH 活性测定参照 Burkina 等^[1]的方法。4-氨基酚标准曲线制备: 分别取 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 4-氨基酚 $0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8$ 和 1.0 mL , 用质量分数为 6% 的三氯醋酸(TCA)补足至 1.0 mL , 加入体积分数为 1% 的苯酚 1 mL , 混匀后再加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Na_2CO_3 溶液 1 mL , 充分混匀后, 放置 30 min , 空白调零, 于 630 nm 处测定各管的吸光度值, 绘制 4-氨基酚标准曲线。AH 活性测定: 取 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NADPH 溶液 0.1 mL 和 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸苯胺溶液 0.5 mL , 置于试管中, 混匀, 对照管加 0.5 mL 超纯水代替苯胺, $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 2 min 。各管均加 0.5 mL 微粒体悬液, $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 再孵育 30 min , 加 1 mL 冰冷的质量分

数为 20% 的 TCA 终止反应。冰浴 5 min , $11000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心, 取上清液 1 mL 于另一试管中, 加体积分数为 1% 的苯酚 1 mL , 混匀, 再加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Na_2CO_3 1.0 mL , 充分混匀后, 放置 30 min , 空白调零, 于 630 nm 处测定各管的吸光度值, 根据标准曲线计算 4-氨基酚浓度, 以 $\text{nmol}(4\text{-氨基酚}) \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 表示其酶活性。

1.9.2 7-乙氧基香豆素-O-脱乙酰酶(ECOD)活性测定

ECOD 活性测定参照李阳等^[12]的方法。7-羟基香豆素标准曲线制备: 分别取 $1.62 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 7-羟基香豆素溶液 $0, 0.25, 0.5, 1, 1.5$ 和 2.0 mL , 用 Tris-HCl 溶液补足到 5.0 mL , 混匀后于 390 nm 激发波长和 440 nm 发射波长下测定上述各浓度 7-羟基香豆素对应的荧光强度, 绘制 7-羟基香豆素标准曲线。ECOD 活性测定: 取 0.5 mL 微粒体蛋白悬液, 加入 $20 \mu\text{L}$ 的底物 7-乙氧基香豆素(终浓度为 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 混匀后以 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{pH} 7.4$ 的 Tris-HCl 缓冲液补充到 1 mL , $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 2 min 后, 测定管加入 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NADPH 0.1 mL , 空白管加入超纯水 0.1 mL 。 $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 20 min 后迅速取出并置于冰上, 加入 1 mL 质量分数为 20% 的 TCA 终止反应。反应完毕后, 将反应混合液于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 5 min , 取上清, 加入 2 mL 甘氨酸-氢氧化钠(Gly-NaOH)溶液($0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{pH} 10.5$), 震荡混匀后, 在激发波长为 335 nm 、发射波长为 455 nm 下测定产物的荧光值, 根据标准曲线计算 7-羟基香豆素浓度, 以 $\text{nmol}(7\text{-羟基香豆素}) \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 表示其酶活性。

1.10 检测条件

1.10.1 HPLC 检测条件

色谱柱为 Agilent Eclipse XDB-C18 ($4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}, 3.5 \mu\text{m}$), 流动相为体积分数为 0.1% 的甲酸水溶液和乙腈($V:V=7:3$), 流速为 $0.4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 进样量为 $20 \mu\text{L}$, 柱温为 $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 检测波长为 283 nm 。

1.10.2 高效液相色谱串联质谱(HPLC-MS/MS)检测条件

色谱柱为 Waters Symmetry C8 ($50 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$), 柱温为 $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 流速为 $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 进样量为 $10 \mu\text{L}$, 流动相 A 为 $0.005 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铵溶液(用甲酸调节 pH 至 2.5), B 为乙腈, 梯度洗脱条件: $0 \sim 5 \text{ min}, 3\% \sim 25\% \text{ B}; 5 \sim 6 \text{ min}, 25\% \sim 35\% \text{ B}; 6 \sim 7 \text{ min}, 35\% \sim 55\% \text{ B}; 7 \sim 8 \text{ min}, 55\% \text{ B}; 8 \sim 9.5 \text{ min}, 55\% \sim 3\% \text{ B}; 9.5 \sim 12.5 \text{ min}, 3\% \text{ B}$ 。

质谱条件:电离模式为ESI+,离子源温度为150℃,多溶剂气温度为350℃,锥孔电压为25V,碰撞能为15eV,扫描模式为SIR和子离子扫描。

2 结果与讨论 (Results and discussion)

2.1 恩诺沙星体外代谢

2.1.1 恩诺沙星体外代谢动力学

恩诺沙星暴露浓度参照文献中的浓度设置^[10],当恩诺沙星体外暴露浓度为1、5和10 mg·L⁻¹时,恩诺沙星体外代谢过程符合一级动力学方程 $\ln C_t/C_0 = -kt$,动力学拟合曲线图1所示。拟合得到恩诺沙星在鲫鱼肝微粒体中的代谢动力学参数,包括消除速率常数(k)、半衰期($t_{1/2}$),如表1所示。当恩诺沙星体外暴露浓度为1、5和10 mg·L⁻¹时,恩诺沙星在鲫鱼肝微粒体中的 k 分别是0.00303、0.00204和0.00266 min⁻¹,半衰期 $t_{1/2}$ 分别是228.8、339.8和260.6 min,其中当恩诺沙星暴露浓度为1 mg·L⁻¹时,其在肝微粒体中的 k 最大,为0.00303 min⁻¹, $t_{1/2}$ 最短,为228.8 min。本研究中恩诺沙星在1、5和10 mg·L⁻¹ 3个暴露浓度条件下的 $t_{1/2}$ 均比Shan等^[13]的研究中恩诺沙星在鲫鱼体内 $t_{1/2}$ (64.66 h)的值低,这可能是体外代谢实验中的恩诺沙星能够与代谢酶直接接触,避免了体内复杂生理因素的干扰,使其代谢转化速率变高,半衰期缩短。

2.1.2 恩诺沙星体外代谢产物

恩诺沙星暴露浓度为10 mg·L⁻¹,孵育90 min,采用HPLC-MS/MS技术,对恩诺沙星及其在鲫鱼肝

微粒体中的代谢产物进行识别。首先,通过对比空白组与实验组的色谱图,共筛选出2种可能存在的代谢产物(M1和M2),其保留时间等信息如表2所示。然后,根据其二级质谱图(图2)的碎片信息,结合母体化合物的结构,初步推测出产物的分子结构。

通过与恩诺沙星标准品的保留时间及碎片离子的比对,可以确定M0为母体化合物恩诺沙星,其保留时间是3.26 min,分子式是[C₁₉H₂₃N₃O₃F]⁺,主要碎片离子是342 [MH-F]⁺、316 [MH-CO₂]⁺和245 [MH-CO₂-C₂H₄NC₂H₅]⁺。环丙沙星是恩诺沙星常见的代谢产物,根据与环丙沙星标准品的保留时间

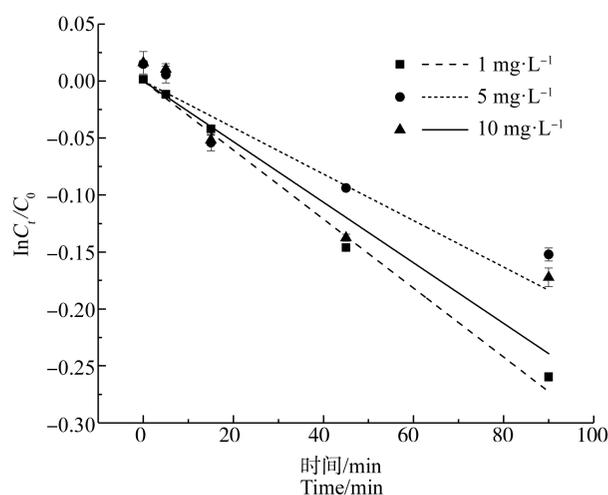


图1 恩诺沙星代谢动力学拟合曲线

Fig. 1 Fitting curve of enrofloxacin metabolic kinetics

表1 恩诺沙星在鲫鱼肝微粒体中的代谢动力学参数

Table 1 Metabolic kinetic parameters of enrofloxacin in liver microsomes of crucian carp (*Carassius auratus*)

恩诺沙星/(mg·L ⁻¹)	动力学方程 Kinetic equations	消除速率常数(k)/min ⁻¹ Depuration rate constants (k)/min ⁻¹	半衰期($t_{1/2}$)/min Half-lives ($t_{1/2}$)/min	拟合度(R^2) Goodness of fit (R^2)
Enrofloxacin/(mg·L ⁻¹)	$\ln C_t/C_0 = -kt$			
1	$y = -0.00303x$	0.00303	228.8	0.99494
5	$y = -0.00204x$	0.00204	339.8	0.98916
10	$y = -0.00266x$	0.00266	260.6	0.94764

表2 恩诺沙星及其在鲫鱼肝微粒体中代谢产物的保留时间、分子量和分子式

Table 2 Retention time, molecular weight and molecular formula of enrofloxacin and its metabolites in liver microsomes of crucian carp (*Carassius auratus*)

化合物名称 Compounds	保留时间/min Retention time/min	分子量 Molecular weight	分子式 Molecular formula
M0	3.26	360	[C ₁₉ H ₂₃ N ₃ O ₃ F] ⁺
M1	2.97	332	[C ₁₇ H ₁₉ FN ₃ O ₃] ⁺
M2	3.12	372	[C ₂₀ H ₂₆ N ₃ O ₄] ⁺

及碎片离子的比对,可以确定 M1 为环丙沙星,保留时间 2.97 min,分子式 $[C_{17}H_{19}FN_3O_3]^+$,主要碎片离子是 245 $[MH-CO_2-C_2H_4NH]^+$ 和 231 $[MH-CO_2-C_2H_5N_2]^+$ 。M2 的保留时间是 3.12 min,准分子离子是 372 $[C_{20}H_{26}N_3O_4]^+$,主要碎片离子是 297 $[MH-CO_2-O-CH_3]^+$ 、257 $[MH-CO_2-O-CH_3-C_3H_4]^+$ 和 241 $[MH-CO_2-O-C_2H_5N-C_2H_4]^+$,其分子量比母体化合物增加了 12 Da,推测是恩诺沙星脱氟后羟基化,再进一步发生甲基化得到的产物。

恩诺沙星在鲫鱼肝微粒体中的代谢是在 CYP450 酶的作用下发生的。细胞色素 P450 酶有很多亚型。其中,在 CYP3A4 亚型作用下,外源污染物能够发生脱甲基、脱乙基反应^[14],在 CYP2E1 亚型作用下外源污染物发生羟基化反应^[15]。因此,推测 M1 是在 CYP3A4 作用下的产物,M2 是 CYP2E1

作用下的产物,CYP3A4 和 CYP2E1 是主要参与恩诺沙星体外代谢的 P450 亚型酶。

2.2 恩诺沙星体外代谢关键酶的确

为了确定参与恩诺沙星代谢关键酶,首先分析了在体外孵育条件下,恩诺沙星对 CYP3A4 和 CYP2E1 亚型酶活性的影响。7-乙氧基香豆素是一种 CYP3A4 亚型的特异性底物,通过 ECOD 反映 CYP3A4 总酶活性,苯胺是 CYP2E1 亚型的特异性底物,以 AH 反映 CYP2E1 总酶活性^[16-17]。在不同浓度恩诺沙星体外暴露的条件下,AH 和 ECOD 酶活性随时间变化趋势如图 3 所示。

恩诺沙星对 AH 和 ECOD 的活性均有一定的抑制作用。AH 活性随时间呈线性下降趋势。当恩诺沙星浓度增加时,对 AH 活性抑制作用增强;ECOD 活性在 0 ~ 5 min 时,下降趋势明显,在 5 min 后

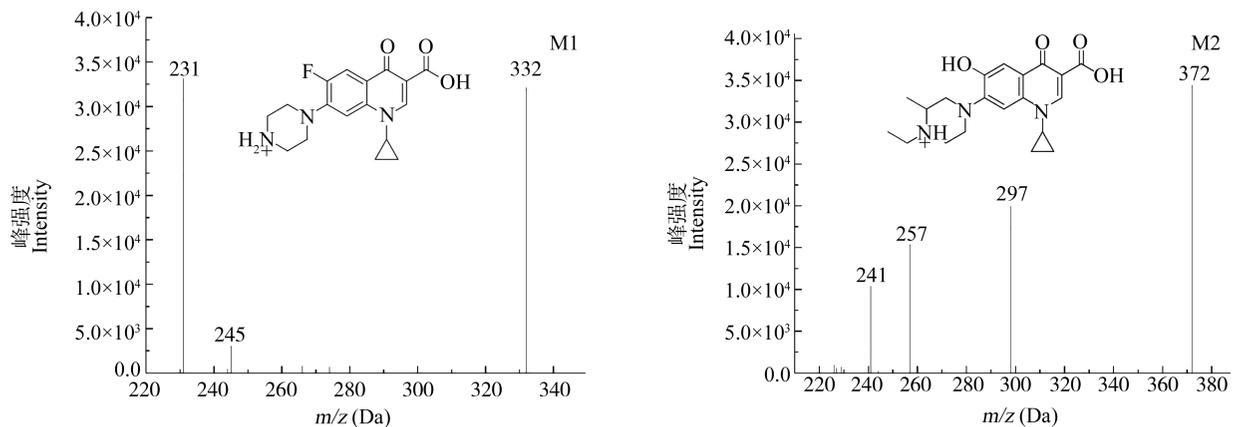


图2 恩诺沙星代谢产物二级质谱图

Fig. 2 MS² spectra of enrofloxacin metabolite

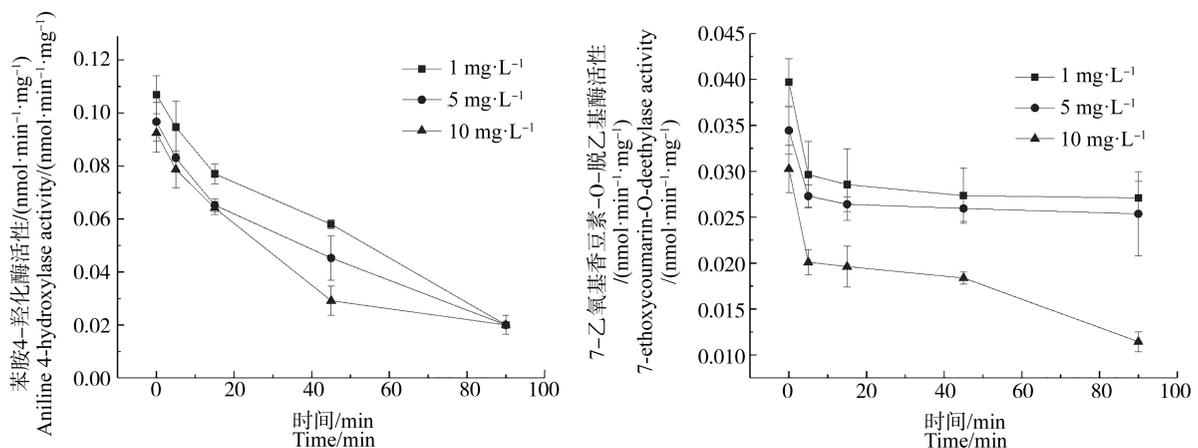


图3 苯胺 4-羟化酶和 7-乙氧基香豆素-O-脱乙基酶活性随时间的变化

Fig. 3 The change of aniline 4-hydroxylase (AH) and 7-ethoxycoumarin-O-deethylase (ECOD) activities with time

ECOD 活性下降趋势逐渐变缓。为了进一步考察恩诺沙星浓度对 AH 和 ECOD 活性的影响,利用 SPSS 对恩诺沙星浓度和酶活性作相关性分析。结果表明,ECOD 活性与恩诺沙星浓度显著性负相关,皮尔逊相关系数为 -0.617 ;AH 活性与恩诺沙星浓度无显著性相关关系($\alpha=0.05$)。恩诺沙星对 ECOD 和 AH 酶活性有抑制作用。这说明,恩诺沙星具有与 CYP3A4 和 CYP2E1 酶结合的能力,CYP3A4 和 CYP2E1 参与了恩诺沙星的代谢。

代谢抑制实验中,加入特异性抑制剂与恩诺沙星共同孵育,根据实验结果可初步判断参与恩诺沙星代谢的 CYP450 酶亚型。选择酮康唑(KTZ)和双硫仑(DIS)分别作为 CYP3A4 和 CYP2E1 的抑制剂,抑制剂浓度为 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,这 2 个浓度的选择参考了文献[18-19],这是能够有效抑制相应 CYP450 亚型活性的浓度。加入不同浓度的 KTZ 和 DIS 后,恩诺沙星在鲫鱼肝微粒体中的代谢转化率有不同程度的降低,其抑制情况如图 4 所示。

如图 4 所示,当恩诺沙星暴露浓度为 1 、 5 和 $10 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 KTZ 和 DIS 对恩诺沙星代谢均有较弱的抑制作用。KTZ 和 DIS 的浓度增加至 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,KTZ 对恩诺沙星代谢的抑制率明显增加,抑制率最高可达 80% ,而 DIS 的浓度改变对恩诺沙星代谢抑制率影响较小。因此,与 CYP2E1 亚型相比,CYP3A4 在恩诺沙星代谢过程中作用更大,CYP3A4 亚型是恩诺沙星在鲫鱼肝微粒体中代谢的关键亚型酶。

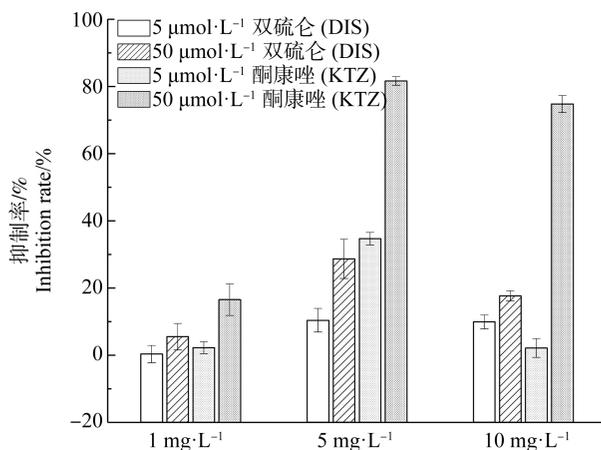


图 4 双硫仑 (DIS) 和酮康唑 (KTZ) 对恩诺沙星体外代谢的影响

Fig. 4 Effects of disulfiram (DIS) and ketoconazole (KTZ) on the *in vitro* metabolism of enrofloxacin

综上所述,恩诺沙星在鲫鱼肝微粒体中的代谢符合一级动力学方程,体外代谢过程中恩诺沙星对 CYP3A4 和 CYP2E1 亚型酶活性有一定的抑制作用,CYP3A4 亚型酶活性与恩诺沙星呈显著性负相关关系,CYP3A4 是参与恩诺沙星代谢的关键亚型酶。本研究结果为探究恩诺沙星在水生生物体内代谢转化路径及其生态风险提供基础数据。

通讯作者简介:赵洪霞(1975—),女,博士,教授,博士生导师,主要研究方向为有机污染物的分析方法学、环境迁移转化行为和暴露风险评估等。

参考文献 (References):

- [1] 牛日华,张天闻,邹红梅,等.恩诺沙星及其代谢物环丙沙星在大黄鱼体内的代谢动力学[J].中国渔业质量与标准,2018,8(1):24-33
Niu Y H, Zhang T W, Zou H M, et al. Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in *Larimichthys crocea* [J]. Chinese Fishery Quality and Standards, 2018, 8(1): 24-33 (in Chinese)
- [2] 陈红英,王月颖,傅思武.抗生素在养殖业中的应用现状[J].现代畜牧科技,2019(5):1-3
Chen H Y, Wang Y Y, Fu S W. Application status of antibiotics in aquaculture [J]. Modern Animal Husbandry Science & Technology, 2019(5): 1-3 (in Chinese)
- [3] 王立红,刘芳,管振国,等.偏碱性恩诺沙星注射液对大鼠亚慢性毒性试验研究[J].天津科技,2017,44(7):49-52
Wang L H, Liu F, Guan Z G, et al. Subchronic toxicity of alkali deviation type enrofloxacin injection in SD rats [J]. Tianjin Science & Technology, 2017, 44 (7): 49-52 (in Chinese)
- [4] Guengerich F P. Cytochrome P450 and chemical toxicology [J]. Chemical Research in Toxicology, 2008, 21(1): 70-83
- [5] Fan J, Shan Q, Wang J, et al. Comparative pharmacokinetics of enrofloxacin in healthy and aeromonas hydrophila-infected crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) [J]. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 2017, 40(5): 580-582
- [6] Morales-Gutierrez F J, Barbosa J, Barron D. Metabolic study of enrofloxacin and metabolic profile modifications in broiler chicken tissues after drug administration [J]. Food Chemistry, 2015, 172: 30-39
- [7] Ruennarong N, Wingpanit K, Sakulthaew C, et al. Dispositions of enronfloxacin and its major metabolite ciprofloxacin in Thai swamp buffaloes [J]. Journal of Veterina-

- ry Medical Science, 2016, 78(3): 397-403
- [8] Bonassa K P D, Miragliotta M Y, Simas R C, et al. Tissue depletion study of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in broiler chickens after oral administration of a new veterinary pharmaceutical formulation containing enrofloxacin [J]. Food & Chemical Toxicology, 2017, 105: 8-13
- [9] 沈梦楠. 典型溴代阻燃剂在鲫鱼体内与体外代谢研究 [D]. 南京: 南京大学, 2012: 51
Shen M N. Metabolism of typical brominated flame retardants by crucian carp *in vivo* and *in vitro* [D]. Nanjing: Nanjing University, 2012: 51 (in Chinese)
- [10] 周帅, 李国烈, 胡琳琳, 等. 恩诺沙星在异育银鲫体内和体外肝微粒体中代谢产物分析[J]. 东北农业大学学报, 2013, 44(6): 101-106
Zhou S, Li G L, Hu L L, et al. *In vivo* and liver microsome *in vitro* analysis of metabolites of enrofloxacin from crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) using UPLC/Q-TOF MS [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2013, 44(6): 101-106 (in Chinese)
- [11] Burkina V, Zlabek V, Rasmussen M K, et al. End-product inhibition of skatole-metabolising enzymes CYP1A, CYP2A19 and CYP2E1 in porcine and piscine hepatic microsomes [J]. Toxicology Letters, 2019, 303: 67-71
- [12] 李阳, 史雪岩, 高希武. 增效醚对二化螟幼虫 7-乙氧基香豆素-O-脱乙基酶和羧酸酯酶活性的影响[J]. 昆虫学报, 2016, 59(11): 1159-1165
Li Y, Shi X Y, Gao X W. *In vivo* effects of piperonyl butoxide on the activities of 7-ethoxycoumarin O-deethylase and carboxylesterase in larval *Chilo suppressalis* (Lepidoptera:Pyralidae) [J]. Acta Entomologica Sinica, 2016, 59(11): 1159-1165 (in Chinese)
- [13] Shan Q, Fan J. Pharmacokinetics of enrofloxacin after oral, intramuscular and crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) [J]. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 2018, 41(1): 159-162
- [14] Hansen J, Palmfeldt J, Pedersen K W, et al. Postmortem protein stability investigations of the human hepatic drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes CYP1A2 and CYP3A4 using mass spectrometry [J]. Journal of Proteomics, 2019, 194: 125-131
- [15] Uwimana E, Ruiz P, Li X S, et al. Human CYP2A6, CYP2B6, and CYP2E1 atropselectively metabolize polychlorinated biphenyls to hydroxylated metabolites [J]. Environmental Science & Technology, 2019, 53(4): 2114-2123
- [16] 陈曦, 王建树, 姜英, 等. B(a)P 和 DEHP 联合染毒对 HepG2 细胞 CYP1A1 和 CYP3A4 酶活性的影响[J]. 环境与职业医学, 2011, 28(9): 525-530
Chen X, Wang J S, Jiang Y, et al. Effects of co-exposure of di-(2-ethylhexyl) phthalate and benzo (a) pyrene on CYP1A1 and CYP3A4 enzyme activities in HepG2 cells [J]. Journal of Environmental & Occupational Medicine, 2011, 28(9): 525-530 (in Chinese)
- [17] Hou R, Huang C, Rao K F, et al. Characterized *in vitro* metabolism kinetics of alkyl organophosphate esters in fish liver and intestinal microsomes [J]. Environmental Science & Technology, 2018, 52(5): 3202-3210
- [18] Shen M N, Cheng J, Wu R H, et al. Metabolism of polybrominated diphenyl ethers and tetrabromobisphenol A by fish liver subcellular fractions *in vitro* [J]. Aquatic Toxicology, 2012, 114-115: 73-79
- [19] 李文, 麦曦, 胡晓. 1-(4-溴苄基)-1-(4-溴苄氧基)脲药代动力学和体外代谢的研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2013, 29(9): 675-678
Li W, Mai X, Hu X. Pharmacokinetics and metabolism of 1-(4-bromobenzyl)-1-(4-bromobenzyloxy) urea *in vitro* [J]. The Chinese Journal of Clinical Pharmacology, 2013, 29(9):675-678 (in Chinese) ◆