

张新灿, 李小定. 氟苯尼考对克氏原螯虾药物代谢酶及相关基因表达的影响[J]. 华中农业大学学报, 2022, 41(2): 191-198.  
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2022.02.023

## 氟苯尼考对克氏原螯虾药物代谢酶及相关基因表达的影响

张新灿, 李小定

华中农业大学食品科学技术学院/环境食品学教育部重点实验室, 武汉 430070

**摘要** 以20~35 g克氏原螯虾为研究对象, 随机分为4组, 每组60尾, 在基础饲料中分别掺拌0 (C0组)、10 (C10组)、20 (C20组)、30 mg/kg (C30组)氟苯尼考喂养20 d, 再改用基础饲料喂养15 d进行消除试验, 测定肝胰腺 I 相药物代谢酶7-乙氧基香豆素-O-脱乙基酶(ECOD)、7-乙氧基异吩恶唑酮-O-脱乙基酶(EROD)、苯胺-4-羟化酶(AH)、红霉素-N-脱甲基酶(ERND)、氨基比林-N-去甲基化酶(AND)和 II 相药物代谢酶谷胱甘肽 S-转移酶(GST)、磺基转移酶(SULT)、尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶(UGT)活力变化, 以及细胞色素 P450 (CYP450)、GST、热休克蛋白 HSP70 和金属硫蛋白(MT)mRNA 表达水平的变化。结果显示, 氟苯尼考显著抑制 I 相药物代谢酶活力, 但能诱导 II 相药物代谢酶活力升高( $P < 0.05$ )。基因表达结果显示, 氟苯尼考可诱导 CYP450 基因表达上调, 10 mg/kg 氟苯尼考可诱导 GST 基因表达上调, 但 20、30 mg/kg 氟苯尼考对 GST 基因表达有抑制作用, 基因表达水平与酶活力变化不一致的现象说明基因转录与蛋白质合成之间并没有必然的联系。10 mg/kg 氟苯尼考通过诱导 HSP70、MT 等基因的表达维持机体的稳态, 但高剂量氟苯尼考超出了机体的承受范围, 引起机体损伤。消除试验结果表明, 经过 15 d 的消除期后, 除 GST 酶活力外, C10 组其余药物代谢酶活力均恢复至正常水平, 4 种药物代谢基因表达水平也恢复至正常水平。为安全起见, 以饲料掺拌方式饲养克氏原螯虾时, 建议氟苯尼考剂量为 10 mg/kg, 既有利于充分发挥药效而不会过早排出体外, 又可避免氟苯尼考剂量过高造成克氏原螯虾机体损伤和在体内蓄积。

**关键词** 氟苯尼考; 克氏原螯虾; 细胞色素 P450; 药物残留; 热休克蛋白; 健康养殖; 药物消除; 基因表达  
**中图分类号** S96 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2022)02-0191-08

克氏原螯虾俗称小龙虾, 因其繁殖速度快、生长迅速、能适应复杂环境, 已成为我国长江中下游地区主要的水产养殖品种。但克氏原螯虾在养殖过程中容易遭受疾病的侵害, 药物使用仍然是目前疾病防治的主要手段, 因此克氏原螯虾的用药问题逐渐成为人们关注的焦点。氟苯尼考因抗菌谱广、疗效显著等特点, 常用于鱼虾病害防治<sup>[1]</sup>, 但其不合理使用或过量使用不仅会对养殖生物和环境造成不利影响, 在食品中的残留甚至会影响人类健康, 因而其在可食性动物组织中的代谢和残留已经引起广泛关注。目前, 关于氟苯尼考作为药物使用仅在凡纳滨对虾<sup>[1]</sup>、鳕<sup>[2]</sup>、鲑<sup>[3]</sup>、虹鳟<sup>[4]</sup>等水产动物中有相关报道, 但是, 在克氏原螯虾养殖中的应用偏少, 研究尚

在起步阶段。因此, 本研究使用在饲料中分别掺拌 10、20、30 mg/kg 氟苯尼考的人工配合饲料喂养克氏原螯虾 20 d 并进行 15 d 的药物消除试验, 测定克氏原螯虾肝胰腺 I 相药物代谢酶 CYP450 亚族 CYP1A、CYP2E 和 CYP3A 的代表酶 7-乙氧基香豆素-O-脱乙基酶(ECOD)、7-乙氧基异吩恶唑酮-O-脱乙基酶(EROD)、苯胺-4-羟化酶(AH)、红霉素-N-脱甲基酶(ERND)、氨基比林-N-去甲基化酶(AND)活力变化, II 相药物代谢酶谷胱甘肽 S-转移酶(GST)、磺基转移酶(SULT)、尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶(UGT)活力变化, 以及 CYP450、GST、热休克蛋白 HSP70、金属硫蛋白(MT)基因表达水平的变化, 探讨药物代谢酶和相关基因对氟苯尼考的生物响应及

收稿日期: 2021-09-18

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFC1606000)

张新灿, E-mail: 2369241050@qq.com

通信作者: 李小定, E-mail: lixd@mail.hzau.edu.cn

其在氟苯尼考代谢过程中的作用,旨在为克氏原螯虾养殖中氟苯尼考的合理使用、科学联合用药及控制药物残留提供科学依据,同时也为克氏原螯虾健康养殖提供技术支持。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验饲料的配制

试验用饲料为自制的人工配合饲料,基础饲料(粗蛋白28%,粗脂肪3%,粗灰分20%,总磷1%,钙0.6%,赖氨酸1.2%,水分12%)经粉碎后过0.25 mm筛网,按比例分别加入10、20、30 mg/kg的氟苯尼考标准品(HPLC $\geq$ 98%,Sigma-Aldrich公司),混匀后加水搅拌,用小型绞肉机加工成条状,50℃烘干后用粉碎机破碎成颗粒,即得氟苯尼考人工配合饲料,4℃冰箱中保存备用。

### 1.2 试验动物分组及管理

克氏原螯虾(体质量20~35 g)购于华中农业大学校内农贸市场,使用基础饲料驯化7 d后开始试验,每天定时观察,剔除死虾。试验开始时挑选附肢完整、健康强壮、有活力的克氏原螯虾,随机分成4组,每组3个平行,每个平行20尾虾。

1)试验分组。C0组(对照组),投喂基础饲料;试验组C10组、C20组、C30组,分别投喂氟苯尼考添加量为10、20、30 mg/kg的人工配合饲料。

2)饲养管理。克氏原螯虾饲养于塑料箱(800 mm $\times$ 600 mm $\times$ 340 mm)中,水温(25 $\pm$ 1)℃,水深(4 $\pm$ 0.5) cm,放入适量水草、泥沙作为隐蔽物,静水连续充氧,每日定时换水1/2,每日按虾体质量的5.0%~8.0%投喂饲料,于08:00和20:00各投喂1次,饲养20 d后全部改用不含氟苯尼考的基础饲料

继续喂养15 d进行消除试验。

### 1.3 样品采集

分别在第1次给药后第5、10、15、20、25、30、35天取试验组和对照组的克氏原螯虾,用自来水将其表面冲洗干净,解剖取肝胰腺,用生理盐水冲洗残留血液,-80℃保存。

### 1.4 肝胰腺S9微粒体的制备

采用沈钧等<sup>[5]</sup>改进的方法,肝胰腺用4℃的磷酸盐缓冲液冲洗3次,每次滤纸吸干并称质量,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的磷酸缓冲液,含1 mmol/L乙二胺四乙酸二钠、1 mmol/L苯甲基磺酰氟、1 mmol/L丙基硫氧嘧啶、0.1 mmol/L二硫苏糖醇和15%甘油),冰浴匀浆,匀浆液在4℃、12 135 r/min离心25 min,用吸管吸去漂浮的酯类物质,上清液即肝胰腺S9微粒体,取上清液至预冷的离心管备用。

### 1.5 代谢酶活力测定

I相药物代谢酶CYP450各亚族选取的代表酶为ECOD、EROD、ERND、AND。II相药物代谢酶选取的代表酶为GST、SULT、UGT。酶活力测定使用齐一生物科技(上海)有限公司和上海江莱生物科技有限公司提供的试剂盒进行。

### 1.6 总RNA提取、cDNA合成及引物设计

采用Trizol法提取总RNA<sup>[6]</sup>,通过分光光度法( $D_{260}/D_{280}$ )和1%琼脂糖凝胶电泳验证RNA的纯度和完整性,使用TaKaRa反转录试剂盒反转录得cDNA。采用荧光定量PCR(qRT-PCR)检测基因CYP450、GST、HSP70、MT的表达,以 $\beta$ -actin作为内参基因。目的基因引物根据GenBank序列设计,引物序列详见表1。

表1 qRT-PCR引物序列

Table 1 Primers used for RT-qPCR assay

| 基因<br>Gene     | 引物序列(5'-3')<br>Primer sequence (5'-3') | 产物长度/bp<br>Products length | GenBank 序列号<br>GenBank ID |
|----------------|--|----------------------------|---------------------------|
| CYP450         | F:ACAGAAAATGGTGAGGGATG                 | 260                        | KM624013.1                |
|                | R:CCAGGAGAGAGATTGGGGTT                 |                            |                           |
| GST            | F:GAGTCTCTGAAGAAAACGCT                 | 94                         | HQ414581.1                |
|                | R:GAAGGAAATCTGGGTAAGTG                 |                            |                           |
| HSP70          | F:TCTCTGTTTCGAGGGTATTG                 | 241                        | DQ301506.1                |
|                | R:CTGGGTTGATTGATTTGTT                  |                            |                           |
| MT             | F:CGACAAGTGTACGTCGGGGT                 | 64                         | GU220368.1                |
|                | R:CTTGAGCAGGTCTTGGCAC                  |                            |                           |
| $\beta$ -actin | F:CAAGGCCAATCGCGAGAAGATGACC            | 173                        | FJ389458.1                |
|                | R:CATACCCCTCGTAGATGGGCACAGT            |                            |                           |

### 1.7 qRT-PCR检测

采用VAZYME(SYBR Green Master Mix)试剂盒进行qRT-PCR分析。cDNA稀释6倍,荧光定量反应体系20 μL:SYBR Green Master Mix 10 μL,正向引物(10 μmol/L)、反向引物(10 μmol/L)各0.4 μL,cDNA 4 μL,50×ROX Reference Dye 2 0.4 μL,灭菌水4.8 μL。反应过程:预变性95 °C 10 min;变性95 °C 15 s;60 °C 60 s,95 °C 15 s,40个循环;以0.5 °C/s从60 °C升温到95 °C绘制熔解曲线。

使用Thermo Scientific Pikoreal Real软件2.1(Thermo)对数据进行分析,目的基因的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法<sup>[7]</sup>计算。

### 1.8 数据处理

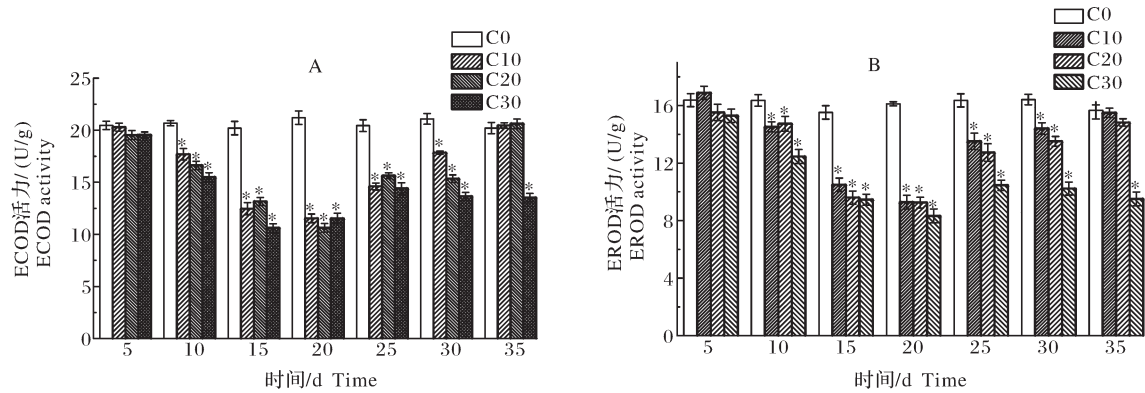
试验数据用“平均值±标准差”表示,使用Ori-

gin 2021软件作图,IBM SPSS Statistics 26进行单因素方差分析,Duncan's法进行显著性分析, $P < 0.05$ 为显著性差异判别标准。

## 2 结果与分析

### 2.1 氟苯尼考对ECOD和EROD活力的影响

由图1可见,投喂氟苯尼考后,ECOD和EROD活力降低。投喂氟苯尼考后第10天,所有试验组ECOD和EROD活力与对照组相比均有显著性差异,之后持续降低( $P < 0.05$ )。消除试验阶段,C10组和C20组ECOD、EROD活力开始恢复,并在第35天恢复至正常水平,与对照组相比没有显著性差异,C30组ECOD和EROD活力较投药期变化不大,停药后第35天仍显著低于对照组( $P < 0.05$ )。



\*表示试验组与对照组之间有显著性差异,下同。\* represents significant differences between the experimental group and the control groups. The same as below.

图1 克氏原螯虾肝胰腺ECOD (A)、EROD (B)活力变化

Fig.1 Changes of ECOD (A) and EROD (B) activities in hepatopancreas of *Procambarus clarkii*

### 2.2 氟苯尼考对AH活力的影响

投喂氟苯尼考后克氏原螯虾肝胰腺AH活力变化如图2所示,试验组AH活力逐渐降低,第5天开始C30组AH活力显著低于对照组,并且在第20天降为最小值,第10天开始C10组和C20组AH活力也显著低于对照组,在第20天降为最小值( $P < 0.05$ )。30 mg/kg 氟苯尼考对克氏原螯虾肝胰腺AH的抑制作用最强,10 mg/kg 氟苯尼考的抑制作用最弱。消除试验结果显示,氟苯尼考停喂后,试验组AH活力逐渐升高,均在第35天恢复至正常值,与对照组相比没有显著性差异。

### 2.3 氟苯尼考对ERND和AND活力的影响

由图3可见,投喂氟苯尼考后试验组ERND、AND活力降低,且呈现降低的趋势,在第20天降为最小值。消除试验阶段,试验组ERND、AND活力开

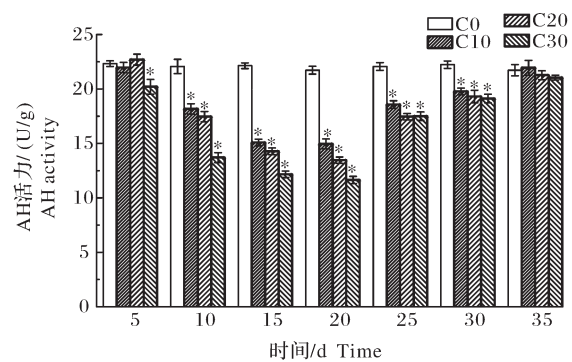


图2 克氏原螯虾肝胰腺AH活力变化

Fig.2 Changes of AH activity in hepatopancreas of *Procambarus clarkii*

始恢复,C10组ERND活力在第30天恢复至正常值,AND活力在第35天恢复至正常水平,与对照组相比没有显著性差异。C20组和C30组ERND、AND活力变化不大,35 d后,ERND活力仍显著低于对照组

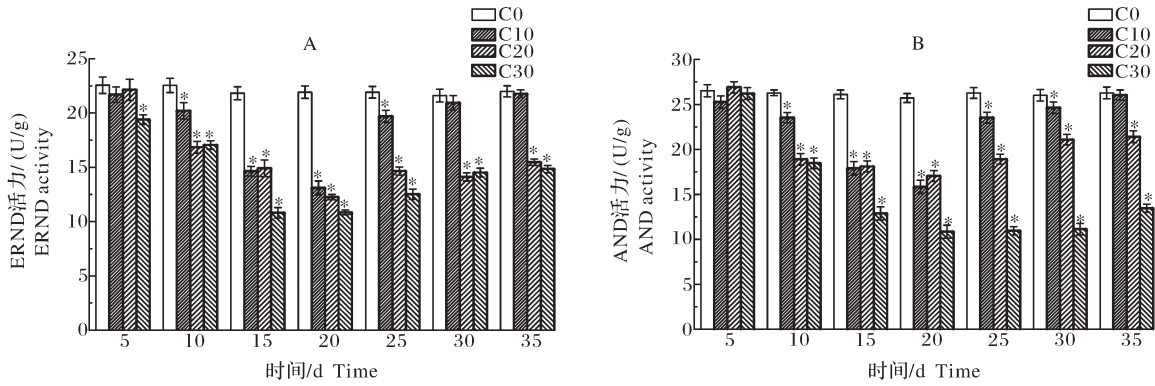


图3 克氏原螯虾肝胰腺ERND (A)、AND (B)活力变化

Fig.3 Changes of ERND (A) and AND (B) activities in hepatopancreas of *Procambarus clarkii*

( $P < 0.05$ ).

2.4 氟苯尼考对GST、SULT、UGT活力的影响

投喂氟苯尼考后,克氏原螯虾肝胰腺GST、SULT、UGT活力变化如图4所示,试验组SULT和UGT活力升高,第10天开始与对照组相比有显著性差异,试验组GST活力在第15天开始与对照组相比有显著性差异,试验组3种酶活力均在第20天达到最大值( $P < 0.05$ )。消除试验结果显示,消除期过

后,C10组和C20组GST活力仍维持在较高水平,较投喂氟苯尼考期间没有太大变化,仍显著高于对照组,而C30组GST活力逐渐降低并恢复至正常水平,与对照组相比没有显著性差异,C10组和C20组SULT活力逐渐恢复至正常水平,而C30组SULT活力降为正常值后仍继续降低并且显著低于对照组,所有试验组UGT活力逐渐降低并恢复至正常水平,且与对照组相比没有显著性差异( $P < 0.05$ )。

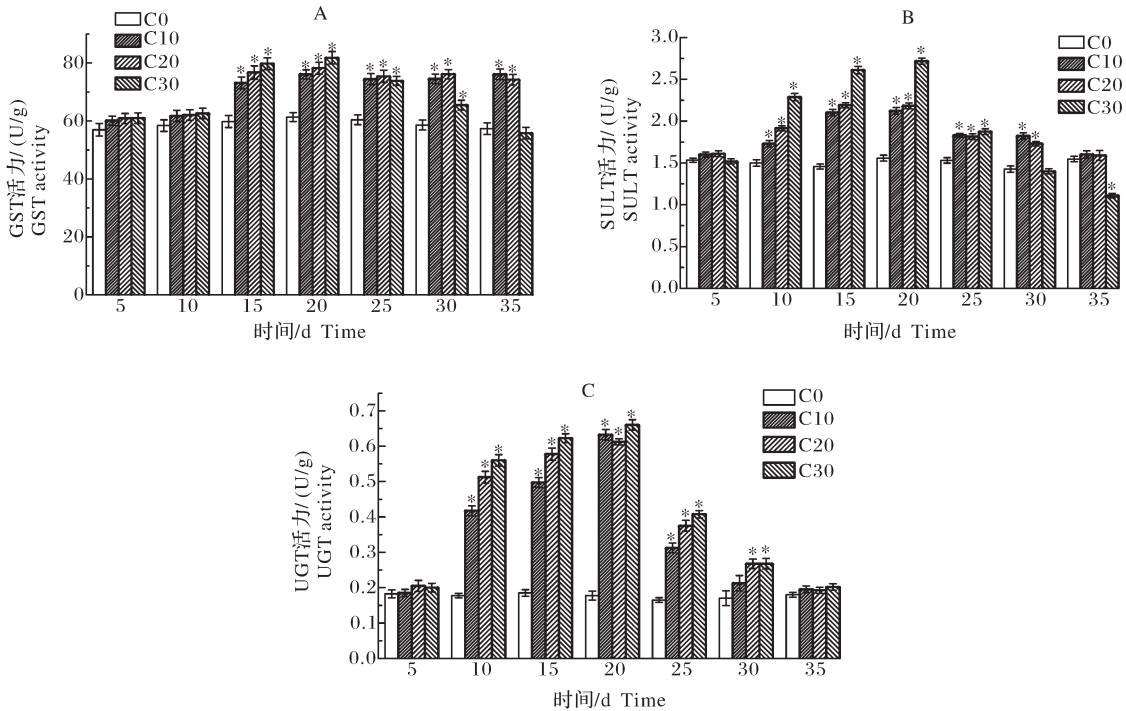


图4 克氏原螯虾肝胰腺GST (A)、SULT (B)及UGT (C)活力变化

Fig.4 Changes of GST (A), SULT (B) and UGT (C) activities in hepatopancreas of *Procambarus clarkii*

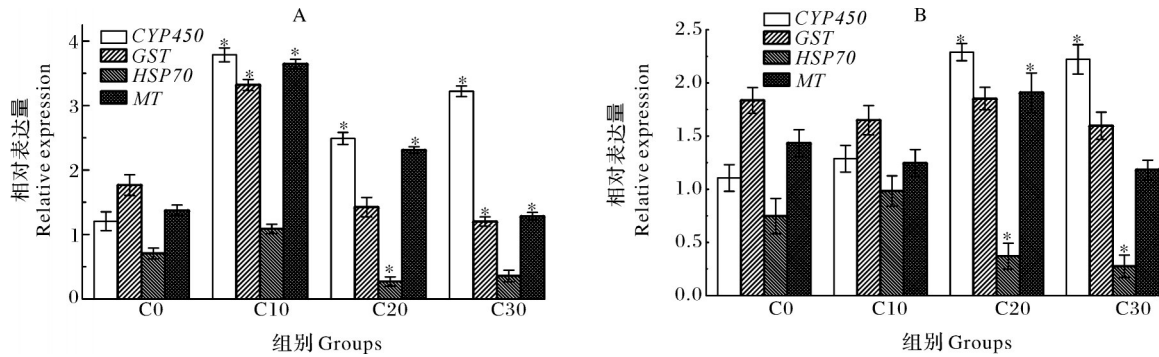
2.5 氟苯尼考对克氏原螯虾基因 mRNA 表达的影响

对克氏原螯虾肝胰腺相关代谢基因 mRNA 表达量进行测定,结果显示,投喂氟苯尼考 20 d 后,试验

组 *CYP450* mRNA 表达上调,并且显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。C10 组 *GST* 和 *HSP70* mRNA 表达量上调,但在 C20 组和 C30 组中的表达下调。投喂氟苯尼考剂量越高,*MT* mRNA 表达量越低,C10 组和 C20

组 *MT* mRNA 表达上调,显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ),但 C30 组 *MT* mRNA 表达量与对照组相比没有显著性差异。消除期过后, C20 组和 C30 组 *CYP450* mRNA 表达量仍维持在较高水平,但 C10 组 *CYP450* mRNA 表达下调并恢复至正常水平。所有试验组 *GST*

mRNA 表达下调并恢复至正常水平。C10 组 *HSP70* mRNA 表达量与对照组没有显著差异,但 C20 组和 C30 组 *HSP70* mRNA 表达量显著低于对照组 ( $P < 0.05$ )。C20 组 *MT* mRNA 表达量仍维持在较高水平,但 C10 组和 C30 组 *MT* mRNA 表达量恢复至正常水平。



A: 投药期结束 End of dosing period; B: 消除期结束 End of elimination period.

图5 克氏原螯虾肝胰腺基因表达

Fig.5 Gene expression in hepatopancreas of *Procambarus clarkii*

### 3 讨论

#### 3.1 氟苯尼考对代谢酶的影响

*CYP450* 酶系是生物代谢药物的第一阶段酶系,与药物的代谢有密切关系<sup>[8]</sup>,*CYP450* 酶活力可被药物诱导或抑制,*CYP450* 酶也可影响药物的代谢进程,影响药物的正常疗效<sup>[9]</sup>。ECOD、EROD、AH、ERND、AND 分别是 *CYP1A*、*CYP2E* 和 *CYP3A* 亚族的标志酶,是生物体内参与药物 I 相代谢反应的重要解毒酶<sup>[11]</sup>。*GST*、*UGT* 和 *SULT* 是 II 相代谢反应中重要的药物代谢转移酶,*GST* 可催化外源性物质的亲电基团与还原型谷胱甘肽的巯基结合<sup>[10]</sup>,*SULT* 是机体内催化多种外源性化合物硫酸化代谢的关键酶,使外源性化合物更有效地排出体外,从而达到解毒的目的<sup>[11]</sup>,*UGT* 可催化外源性化合物生成葡萄糖醛酸结合物<sup>[12]</sup>。本试验发现投喂氟苯尼考后,克氏原螯虾肝胰腺 5 种 I 相代谢酶活力降低,说明肝胰腺细胞中氧化酶数量不断减少,而稳定后的状态说明氟苯尼考不能无限制抑制氧化酶,这与前人研究发现药物对水产动物 *CYP450* 酶大多表现为抑制作用一致<sup>[13]</sup>,所以推测这些酶参与氟苯尼考在克氏原螯虾体内的代谢反应。此外,该结果说明经 *CYP450* 酶代谢的氟苯尼考在肝脏中首过效应降低,生物利用度增加,使用时要充分考虑其用量<sup>[12]</sup>。我们发现氟苯尼考对不同 *CYP450* 酶的抑制效果不同,

推测在氟苯尼考代谢的过程中,不同 *CYP450* 酶与氟苯尼考可能存在竞争机制和选择性,或者可能是由于不同的酶结构所致<sup>[14]</sup>,这表明不同亚群酶在抑制时间或抑制程度上存在差异。试验组 *GST* 活力在投喂氟苯尼考 15 d 后显著高于对照组,迟于 5 种 *CYP450* 酶,说明氟苯尼考或其代谢产物在体内积累,减弱了 *CYP450* 酶的代谢结合能力,*GST* 迅速对这些物质进行解毒,缓解机体代谢压力<sup>[15]</sup>。*SULT* 和 *UGT* 也被氟苯尼考诱导,但发挥作用的时间与 *GST* 不同,这种差别表明这 3 种酶在克氏原螯虾中是独立地发挥作用。而消除试验结果表明,消除期过后, C10 组 5 种 I 相代谢酶活力均恢复至正常水平,说明克氏原螯虾可通过自身的调节机制完成氟苯尼考的代谢,避免造成机体损伤。而用 20 mg/kg 和 30 mg/kg 氟苯尼考喂养克氏原螯虾在停喂氟苯尼考后继续用普通饲料饲养 15 d,部分酶活力还不能恢复,表明高剂量氟苯尼考超出了克氏原螯虾自身的承受能力,引起的氧化损伤破坏了酶的结构。在消除试验阶段, C10 组和 C20 组 *GST* 活力仍然较高,目的是清除氟苯尼考在体内的残留,但 C30 组 *SULT* 活力显著低于对照组,原因可能是暴露期氟苯尼考剂量过高,超出了 *SULT* 的承载力。此现象说明克氏原螯虾在氟苯尼考低剂量下能够对自身解毒机制进行调节来完成氟苯尼考的代谢,高剂量氟苯尼考对克氏原螯虾造成氧化损伤<sup>[16]</sup>。

### 3.2 氟苯尼考对相关基因表达的影响

本研究结果表明氟苯尼考对 *CYP450* 基因表达有显著的诱导作用,但基因表达水平与酶活力变化不一致。有研究报道,天然提取物处理的细胞中 *CYP1A1* 亚型 mRNA 转录水平与蛋白表达之间没有相关性<sup>[17]</sup>,多氯联苯可诱导 *CYP1A1* 蛋白的表达,但对 *CYP1A1* 亚型 mRNA 的转录无影响<sup>[18]</sup>,这说明 mRNA 转录和蛋白质表达之间可能不遵循线性关系,而是具有更为复杂的关系<sup>[13]</sup>。本试验发现氟苯尼考在转录水平上诱导 *CYP450* mRNA 的表达,但抑制 *CYP450* 酶活力,说明此抑制作用不通过转录水平调控,而是蛋白质合成过程受阻,具体的相关机制仍有待进一步探究。投喂氟苯尼考期间,C10组 *GST* 基因表达显著上调,说明低剂量氟苯尼考对 *GST* 基因表达有诱导作用,催化谷胱甘肽等内源性化合物与 I 相代谢产物结合,减少氟苯尼考与细胞结合,降低氟苯尼考对机体产生的危害<sup>[19]</sup>。C20组和 C30组 *GST* 基因表达量低于对照组,但 *GST* 活力显著高于对照组,说明高剂量氟苯尼考虽抑制 *GST* 基因表达,但蛋白质合成过程可能不受影响。热休克蛋白 HSP70 是广泛存在于细胞内、高度保守的可溶性蛋白<sup>[20]</sup>,生物受到刺激后,HSP70 可通过维持蛋白质构象、抗凋亡、细胞保护等作用以维持机体稳态,抵抗一系列应激<sup>[21]</sup>,与生物的环境适应能力密切相关。本研究发现投喂 10 mg/kg 氟苯尼考时,*HSP70* mRNA 表达上调,当氟苯尼考剂量增加时,*HSP70* mRNA 表达下调,并且低于对照组,说明高剂量氟苯尼考引起克氏原螯虾的机体损伤<sup>[13]</sup>。MT 主要功能是维持生物体内必需金属元素的稳定和非必需金属元素的解毒,是一类多功能诱导性的小分子蛋白家族,MT 富含半胱氨酸,具有很强的自由基清除能力,能有效清除机体羟基自由基<sup>[22]</sup>。MT 的抗氧化作用不仅表现为能直接清除 OH<sup>-</sup>,还能显著提高超氧化物歧化酶的活力,在机体解毒过程和抗氧化防御方面发挥重要的作用<sup>[16]</sup>。本研究中,氟苯尼考诱导 *MT* mRNA 表达上调,但表达量随氟苯尼考剂量的增大而减少,说明氟苯尼考导致肝脏细胞产生自由基,引起了氧化应激,克氏原螯虾可以通过 *MT* mRNA 表达应对低剂量氟苯尼考造成的这种改变,但高剂量氟苯尼考超出了机体的承受范围,大量的自由基对机体造成一定的损伤。

消除试验的结果表明,氟苯尼考停药 15 d 后,C20 组和 C30 组部分基因表达没有恢复至正常水平,说明高剂量氟苯尼考对克氏原螯虾造成的氧化损伤需要更长的休药期来恢复甚至不能恢复。

综上,氟苯尼考对 I 相药物代谢酶具有抑制作用,但对 II 相药物代谢酶具有诱导作用。基因表达结果表明,氟苯尼考可诱导 *CYP450* 基因表达上调,10 mg/kg 氟苯尼考诱导 *GST* 基因表达上调,但 20 mg/kg 和 30 mg/kg 氟苯尼考抑制 *GST* 基因表达,基因表达与酶活力变化不一致的现象说明基因转录与蛋白质合成之间并没有必然的联系;10 mg/kg 氟苯尼考通过诱导 *HSP70*、*MT* 等基因的表达维持机体的稳态,但高剂量氟苯尼考超出了机体的承受范围,引起机体损伤。因此,为安全起见,以饲料掺拌方式喂养克氏原螯虾时,建议氟苯尼考剂量为 10 mg/kg,既有利于充分发挥药效而不会过早排出体外,又可避免氟苯尼考剂量过高造成克氏原螯虾机体损伤和在体内蓄积。

### 参考文献 References

- [1] FODEY T L, GEORGE S E, TRAYNOR I M, et al. Approaches for the simultaneous detection of thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine using immunochemical techniques [J]. *Journal of immunological methods*, 2013, 393(1/2): 30-37.
- [2] SAMUELSEN O B, BERGH Ø. Efficacy of orally administered florfenicol and oxolinic acid for the treatment of vibriosis in cod (*Gadus morhua*) [J]. *Aquaculture*, 2004, 235 (1/2/3/4): 27-35.
- [3] HORSBERG T E, HOFF K A, NORDMO R. Pharmacokinetics of florfenicol and its metabolite florfenicol amine in Atlantic salmon [J]. *Journal of aquatic animal health*, 1996, 8 (4) : 292-301.
- [4] SHIRY N, SOLTANIAN S, SHOMALI T, et al. Immunomodulatory effects of orally administered florfenicol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following experimental challenge with streptococcosis/lactococcosis [J]. *International immunopharmacology*, 2019, 73: 236-245.
- [5] 沈钧,徐佩佩,金锡鹏.肝脏中细胞色素 P450 测定方法的改进[J]. *工业卫生与职业病*, 1997, 23(4) : 236-238. SHEN J, XU P P, JIN X P. Improvement of determination method of cytochrome P450 in liver [J]. *Industrial health and occupational diseases*, 1997, 23(4) : 236-238 (in Chinese).
- [6] LIU F, GENG C, QU Y K, et al. The feeding of dietary *Codonopsis pilosula* polysaccharide enhances the immune responses, the expression of immune-related genes and the

- growth performance of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) [J]. Fish & shellfish immunology, 2020, 103: 321-331.
- [7] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [8] INGELMAN-SUNDBERG M, SIM S C, GOMEZ A, et al. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoeigenetic and clinical aspects [J]. Pharmacology & therapeutics, 2007, 116(3): 496-526.
- [9] JAMES M O, BOYLE S M. Cytochromes P450 in Crustacea [J]. Comparative biochemistry and physiology part C: pharmacology, toxicology and endocrinology, 1998, 121 (1/2/3): 157-172.
- [10] BOARD P G, MENON D. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology [J]. Biochimica et biophysica acta, 2013, 1830(5): 3267-3288.
- [11] LINDSAY J, WANG L L, LI Y, et al. Structure, function and polymorphism of human cytosolic sulfotransferases [J]. Current drug metabolism, 2008, 9(2): 99-105.
- [12] UNO Y, UEHARA S, INOUE T, et al. Molecular characterization of functional UDP-glucuronosyltransferases 1A and 2B in common marmosets [J/OL]. Biochemical pharmacology, 2020, 172: 113748 [2021-09-18]. <https://doi.org/1016/j.bcp.2019.113748>.
- [13] PAN L Q, REN J Y, LIU J. Responses of antioxidant systems and LPO level to benzo (a) pyrene and benzo (k) fluoranthene in the haemolymph of the scallop *Chlamys ferrari* [J]. Environmental pollution, 2006, 141(3): 443-451.
- [14] CUI Y L, XUE Q, ZHENG Q C, et al. Structural features and dynamic investigations of the membrane-bound cytochrome P450 17A1 [J]. Biochimica et biophysica acta (BBA) - biomembranes, 2015, 1848(10): 2013-2021.
- [15] FITZPATRICK P J, SHEEHAN D, LIVINGSTONE D R. Studies on isoenzymes of glutathione S-transferase in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* with exposure to pollution [J]. Marine environmental research, 1995, 39 (1/2/3/4): 241-244.
- [16] PAN L Q, REN J Y, LIU J. Effects of benzo (k) fluoranthene exposure on the biomarkers of scallop *Chlamys ferrari* [J]. Comparative biochemistry and physiology part C: toxicology & pharmacology, 2005, 141(3): 248-256.
- [17] SERGENT T, DUPONT I, EVAN DER HEIDEN E, et al. CYP1A1 and CYP3A4 modulation by dietary flavonoids in human intestinal Caco-2 cells [J]. Toxicology letters, 2009, 191 (2/3): 216-222.
- [18] 董飞, 张小平, 聂丽云, 等. 丁香酸和柠檬苦素对小鼠肝脏 CYP450 酶的影响 [J]. 药学研究, 2017, 36 (11): 638-642.
- [19] DONG F, ZHANG X P, NIE L Y, et al. Effects of syringic acid and limonin on liver CYP450 isozymes in mice [J]. Journal of pharmaceutical research, 2017, 36 (11): 638-642 (in Chinese with English abstract).
- [20] JIN Y X, ZHANG X X, SHU L J, et al. Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Chemosphere, 2010, 78(7): 846-852.
- [21] CHENG C H, YANG F F, LING R Z, et al. Effects of ammonia exposure on apoptosis, oxidative stress and immune response in pufferfish (*Takifugu obscurus*) [J]. Aquatic toxicology, 2015, 164: 61-71.
- [22] VACCARO E, GIORGI M, LONGO V, et al. Inhibition of cytochrome P450 enzymes by enrofloxacin in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) [J]. Aquatic toxicology, 2003, 62 (1): 27-33.
- [23] CHATTERJEE S, KUMARI S, RATH S, et al. Diversity, structure and regulation of microbial metallothionein: metal resistance and possible applications in sequestration of toxic metals [J]. Metallomics, 2020, 12(11): 1637-1655.

## Effects of florfenicol on changes of metabolic enzymes and related genes in *Procambarus clarkii*

ZHANG Xincan, LI Xiaoding

*Key Laboratory of Environmental Correlative Dietology, Ministry of Education/  
College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*

**Abstract** Taking *Procambarus clarkii* as the research object, they were randomly divided into 4 groups with 60 tails in each group. They were fed with basic feed coated with florfenicol of 0 (C0), 10 (C10), 20 (C20) and 30 mg/kg (C30) for 20 d followed by a period of feeding without florfenicol for 15 days to evaluate the elimination pattern. The activities of hepatopancreatic phase I drug metabolizing enzymes 7-ethoxycoumarin-O-deethylase (ECOD), 7-ethoxyisophenoxazolone-O-deethylase (EROD), aniline-4-hydroxylase (AH), erythromycin-N-demethylase (ERND), aminopyrine-N-demethylase (AND), phase II drug metabolizing enzymes glutathione-S-transferase (GST), sulfotransferase (SULT), and uridine diphosphate glucuronosyltransferase (UGT) were measured. Expression levels of cytochrome P450 (*CYP450*), *GST*, heat shock protein 70 (*HSP70*) and metallothionein (*MT*) mRNA were measured. The results showed that florfenicol significantly reduced phase I metabolic enzymes activities but increase phase II metabolic enzymes activities ( $P < 0.05$ ). The results of gene expression showed that florfenicol could up-regulate *CYP450* gene expression. Florfenicol of 10 mg/kg up-regulated *GST* gene expression, but 20 mg/kg and 30 mg/kg florfenicol could inhibit *GST* gene expression. The inconsistency between gene expression and enzyme activity showed that there was no inevitable relationship between gene transcription and protein synthesis. The results suggest that 10 mg/kg florfenicol maintains the homeostasis of the body by inducing the expression of *HSP70*, *MT* and other genes, but high-dose florfenicol is beyond the tolerance of the body and causes damages to the organism. The results of elimination test showed that after 15 days of elimination, except *GST* enzyme activity, the activities of other drug metabolism enzymes in C10 group returned to normal level, and the expression levels of four drug metabolism genes also returned to normal level. For the sake of safety, when feeding *P. clarkii* with florfenicol, the recommended dose is 10 mg/kg, which is not only conducive to give full play to the efficacy without being excluded from the body prematurely, but also avoid the body damage and accumulation caused by too high dose of florfenicol.

**Keywords** florfenicol; *Procambarus clarkii*; cytochrome P450; drug residue; heat shock protein; healthy aquaculture; drug elimination; gene expression

(责任编辑:边书京)