

密级:

论文编号:

中国农业科学院

博士学位论文

“喹胺醇”药代动力学及非临床毒理学研究
Studies of pharmacokinetics and nonclinical toxicology testing of
kuianchun

博士研究生: 李建喜

指导教师: 杨志强 研究员

申请学位类别: 农学博士

专 业: 预防兽医学

研 究 方 向: 兽医药理毒理学

培 养 单 位: 兰州畜牧与兽药研究所

提交日期 2006 年 12 月 21 日

Degree of Classification:

Number of Thesis:

Chinese Academy of Agricultural Sciences
A Dissertation for the Dr.Degree

**Studies of pharmacokinetics and nonclinical toxicology
testing of *kuianchun***

**Doctoral
candidate : Li Jianxi**

Supervisor : Prof. Yang Zhiqiang

Major : Preventive Veterinary Science

**Speciality : Veterinary pharmacology and
toxicology**

**Institute : Lanzhou institute of animal sciences
and veterinary pharmaceuticals of
CAAS**

Submission in December 2006

评阅人和答辩委员会

论文评阅人：安黎哲 兰州大学生命科学院

殷 宏 中国农业科学院兰州兽医研究所

崔 燕 甘肃农业大学动物医学院

答辩委员会主席：赵兴绪 甘肃农业大学动物医学院

答辩委员会成员：才学鹏 中国农业科学院兰州兽医研究所

余四九 甘肃农业大学动物医学院

陈 强 兰州大学生命科学院

柳纪省 中国农业科学院兰州兽医研究所

王建林 兰州大学生命科学院

杨国林 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所

答辩时间：2006 年 12 月 21 日

独创性声明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作过的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：

时间： 年 月 日

关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

研究生签名：

时间： 年 月 日

导师签字：

时间： 年 月 日

摘 要

喹胺醇是中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所研制的一种新型药物性饲料添加剂, 是二氮杂萘-N, N'-1, 4-二氧化物不同侧链结构衍生物, 和喹烯酮、喹赛多一样属结构创新类药物, 毒性和残留均低于喹乙醇, 抗菌促生长作用明显。本论文利用 RP-HPLC 技术, 分析了喹胺醇的药代动力学及排泄途径; 用 RT-PCR 技术, 开展了喹胺醇对肝 CYP450 亚型基因表达及其同工酶活性影响研究; 用酶学和放免法, 研究了喹胺醇对机体自由基代谢、腹腔巨噬细胞 NO、以及细胞免疫活性因子 TNF、IL-2、IL-6 的影响。旨在为临床合理、安全使用喹胺醇提供指导, 为动物源性食品安全生产提供新的候选药品, 并为兽医药理毒理学研究提供新思路。

结果: (1) 猪单次口服 300mg/kg 体重喹胺醇后, 药代动力学符合一室开放模型, 单次静脉注射 3.0mg/kg 体重喹胺醇后药代动力学符合二室模型, 鸡连续口服 100mg/kg 体重喹胺醇后药代动力学符合二室开放模型; 无论口服还是静注, 靶动物体内喹胺醇的吸收和分布半衰期均较短, 但高剂量或连续口服给药后消除半衰期相对较长; 该药绝对生物利用度较低 (45.56%), 口服后 53.76% 以原形经肠道随粪便排泄, 原药随尿排泄率仅为 0.31%。(2) 连续 7d 大鼠口服喹胺醇, 200 和 400mg/kg 体重组鼠肝 CYP2E1、CYP3A1 mRNA、400mg/kg 体重组 CYP1A1 mRNA 的表达量低于对照组 ($P<0.05$); 肝 CYP450 含量低于、Cyt b5 含量高于对照组 ($P<0.05$), 微粒体蛋白含量随给药剂量而升高; 同工酶 APND 和 EMND 活性低于、EROD 活性高于对照组 ($P<0.05$), 并有性别差异; 肝微粒体 GST 活性 50 和 100mg/kg 剂量组高于、200 和 400mg/kg 剂量组低于对照组。(3) 单剂量给猪口服喹胺醇, 2-48h 血 GSH 降低、CAT 活性升高 ($P<0.05$), 其它抗氧化酶以及 MDA 无明显变化; 静注喹胺醇 5min-1h, 血 SOD 活性明显降低、MDA 含量显著升高 ($P<0.05$), 8h 后接近给药前水平。小鼠连续 30d 口服喹胺醇, 血 GSH 和 CAT 活性无明显变化、但 GST 活性先降后升、GSH-Px 活性降低、SOD 活性先升后降, 停药 10d 后除 GST 外其它抗氧化酶活性与对照组间均无明显差异; 180mg/kg 体重以上剂量组鼠血 MDA 含量明显升高 ($P<0.05$); 肝组织羟自由基水平 30d 前均高于对照组 ($P<0.01$), 抗超氧阴离子水平仅 10d 时高于对照组 ($P<0.05$); 停药 10d 后, 仅 400mg/kg 剂量组羟自由基高于、抗氧化力低于对照组。(4) 将 LPS 或 LPS 和喹胺醇加入体外培养小鼠腹腔巨噬细胞培养介质后, 喹胺醇组细胞培养液 NO 水平均低于 LPS 组 ($P<0.01$), 但无剂量-效应关系; 400 μ g/mL 喹胺醇对 NO 水平影响最小, 且 6h 有诱导 iNOS 活性的作用。(5) 小鼠连续口服喹胺醇, 雄鼠 631.67mg/kg 饲料剂量、雌鼠 105.56mg/kg 饲料剂量对 TNF、IL-6 有诱导作用, 对 IL-2 无明显影响。(6) 饲料添加 75、150、300、600mg/kg 的喹胺醇饲喂大鼠 40d, 血、淋巴细胞数量与对照组间无差异, 亦无明显组织病理学变化。

结论: (1) 喹胺醇在靶动物体内吸收和分布较快, 但高剂量或连续给药后消除较慢, 生物利用度低, 主要以原形经肠道随粪便排泄。(2) 高剂量喹胺醇对肝 CYP450 酶及其亚型 CYP3A1、CYP2E1 有抑制作用, 并有性别差异。(3) 单次给药后不会导致机体发生氧应激性损伤, 连续用药后可诱导机体抗氧化机能紊乱、自由基水平升高, 停药期后均转为正常。(4) 喹胺醇可抑制 LPS 诱导小鼠腹腔巨噬细胞产生 NO 的能力。(5) 喹胺醇对细胞因子 TNF、IL-6 有诱导作用, 存在性别差异。(6) 临床使用喹胺醇时, 如严格遵循添加量、停药期和靶动物, 均不会对消费者造成潜在毒性作用。

关键词: 喹胺醇, 药代动力学, CYP450, 同工酶, 自由基, NO/NOS, 细胞因子

Abstract

Kuianchun, a new structural derivative like *kuixitong* and *kuisaiduo* from quinoxaline 1,4-dioxide, is a new animal feed additive which was synthesized by Lanzhou institute of animal sciences and veterinary pharmaceutics of Chinese academy of agricultural sciences. The previous study showed that it was less hypotoxicity and residues in edible pork or chicken, was the most potent growth-promoting and antibacterial property than olaquinox and others. In present study, in order to provide new drug candidate for safety of food from animals, provide new reference and scientific data for clinical practice about *kuianchun*, the pharmacokinetics and excretion path were analysed in target animals with reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC), sub-type genes expression of and isoenzymes activity of cytochrome P450 of liver in rats were examined by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and enzyme assay, reactive oxygen species, nitric oxide, nitric oxide synthase, antioxidant enzymes were measured with spectrophotometric method, and cytokines (TNF, IL-2, IL-6) in serum were assayed by radioimmunoassay.

RESULTS: (1) A one-compartment body model was observed after oral administration at single dose of 300 mg/kg.body weight (mg/kg.bw) in weanling piglets. A two-compartment body model was observed after injection in vein at dose of 3.0 mg/kg.bw in weanling piglets. A two-compartment body model was observed after oral administration drug at dose of 100 mg/kg.bw.day for 7 days. The bioavailability of *kuianchun* was 45.56%. 53.76% *kuianchun* was excreted with feces and 0.31% with urine after oral administration.

(2) After wistar male rats were orally administered *kuianchun* (50, 100, 200, 400mg/kg.bw. day) for 7 days, hepatic CYP 2E1 and CYP 3A1 mRNA expression at dose of 200, 400 mg/kg.bw, and CYP 1A1 mRNA expression at dose of 400 mg/kg.bw were down-regulated ($P < 0.05$). Hepatic cytochrome P450 content was decreased and cytochrome b5 content was increased in drug treated rats ($P < 0.05$), and protein level of hepatic microsome was increased with drug doses. Activity of aminopyrine N-demethylase (APND) and erythromycin N-demethylase (EMND) were inhibited, and 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity was induced by *kuianchun*, respectively. There were different changes of CYP450 isoforms activity between female and male rats. Glutathione-S-transferase activity of liver microsome was higher at 50, 100 mg/kg.bw than that of 200, 400 mg/kg.bw.

(3) Catalase (CAT) activity was increased and glutathione (GSH) content was decreased from 2-48h in blood after pigs were orally administered drug at dose of 300 mg/kg.bw, superoxide dismutase (SOD) activity was decreased and malondialdehyde (MDA) content was increased from 5min-1h after injection drug in vein for pigs, other antioxidants were not markedly affected by drug. However, GSH content and CAT activity were not obviously changes after continually oral administration for

30d, glutathione-S-transferase (GST) activity was decreased before 10 day and increased after 20 day, glutathione peroxidase (GSH-Px) activity was decreased, SOD activity was contrary changes to GST. MDA content was increased at dose of 180mg/kg.bw, the level of reactive oxygen species ($\cdot\text{OH}$) in liver was increased at all dose, the property against superoxide anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) was increased at 10d and decreased at 20, 30d . All changes about oxidants and antioxidants were not observed at 10-day after drug retreat at dose of 50, 100, 200 mg/kg.bw.

(4) In vitro, lipopolysaccharide (LPS), LPS and *kuianchun* were added in culture medium of celiac macrophage from mice, nitric oxide (NO) content of LPS+*kuianchun* group was lower than that of LPS group ($P<0.01$), there was not dose-defense between doses and NO level change. However, there was not obviously changes on NO, and there was increased in activity of inducible nitric oxide synthase (iNOS) at concentration of 400 $\mu\text{g/mL}$ *kuianchun* after 6 hours.

(5) After being continuously administered *kuianchun* for 14 days, tumor necrosis factor (TNF), interleukin-6 (IL-6) concentration were increased at dose of 631.67mg/kg.diet in male mice, and at dose of 105.56mg/kg.diet in female mice. Interleukin-2 (IL-2) concentration was not affected by drug treatment.

(6) There were not obviously changes on blood cell and lymphocyte, and histopathological change was not observed on liver, kidney, spleen, heart and others in rats at 75, 150, 300, 600mg/kg.diet for 40 days.

CONCLUAION: (1) The velocity of absorption and distribution of *kuianchun* was quick in target animals, but bioavailability was lower. The elimination was slow at single high dose or multi-dose. Much of *kuianchun* was excreted from intestine with feces. (2) CYP450 isoenzyme was inhibited by high dose *kuianchun*. (3) There was not induction to oxidative stress injury by single dose of *kuianchun*, but was induction to lipid peroxidation (LPO) and disorder of free radicals by multi-dose. However, these phenomena were not observed after drug was retreated for 10 days. (4) The performance of LPS to induce NO was inhibited by *kuianchun*. (5) TNF, IL-6 was induced by *kuianchun* at dose from 105.56~631.67mg/kg.diet in mice, which was different between female and male rats. (6) Any potential adverse effect will not induced by *kuianchun* to those consumers if target animals, additive dose and drug withdrawal period conform to design for clinical practice.

Key words: *kuianchun*, pharmacokinetics, cytochrome P450, isoenzyme, free radicals, nitric oxide/nitric oxide synthase, cytokine.

目 录

第一章 前 言	1
1.1 研究背景、目的和意义	1
1.1.1 研究背景	1
1.1.2 本研究的目的和意义	2
1.2 国内外研究进展	3
1.2.1 药物安全性评价的意义	3
1.2.2 饲料添加剂在畜牧业生产中的作用	3
1.2.3 抗菌促生长类药物添加剂	4
1.2.4 兽用喹噁啉类药物	5
1.2.5 药代动力学研究	7
1.2.6 细胞色素 P450 酶在新药研究中的作用	7
1.2.7 自由基在动物体内的生物学作用	9
1.2.8 兽药的免疫毒理评价意义	12
1.3 研究内容与方法	14
1.3.1 研究内容	14
1.3.2 研究方案	14
第二章 喹胺醇药代动力学研究	15
2.1 喹胺醇结构鉴定	15
2.1.1 材料与方法	15
2.1.2 结果	15
2.1.3 讨论	17
2.2 喹胺醇在猪体内药代动力学研究	18
2.2.1 材料与方法	18
2.2.2 结果	19
2.2.3 讨论	26
2.3 喹胺醇在猪体内排泄	29
2.3.1 材料与方法	29
2.3.2 结果	30
2.3.3 讨论	38
2.4 多剂量口服喹胺醇在鸡体内药代动力学研究	40
2.4.1 材料与方法	40
2.4.2 结果	41
2.3.3 讨论	45
第三章 喹胺醇对大鼠肝细胞色素 P450 酶的影响研究	47
3.1 喹胺醇对大鼠细胞色素 P450 酶亚型 mRNA 表达水平的影响	48

3.1.1	材料和方法	48
3.1.2	结果	50
3.1.3	讨论	53
3.2	喹胺醇对大鼠肝细胞色素 P450 同工酶活性影响	57
3.2.1	材料与方法	57
3.2.1	结果	58
3.2.3	讨论	65
第四章	喹胺醇对机体自由基代谢影响研究	69
4.1	喹胺醇诱导仔猪氧化损伤的潜在性作用	69
4.1.1	材料和方法	69
4.1.2	结果	71
4.1.3	讨论	78
4.2	喹胺醇对小鼠抗氧化机能影响研究	79
4.2.1	材料和方法	79
4.2.2	结果	80
4.2.3	讨论	84
第五章	喹胺醇对鼠腹腔巨噬细胞 NO 和细胞因子影响	88
5.1	不同添加剂量喹胺醇对大鼠血液学和组织形态学影响	88
5.1.1	材料与方法	88
5.1.2	结果	88
5.1.3	讨论	95
5.2	喹胺醇对小鼠腹腔原代巨噬细胞 NO 及其酶的影响	96
5.2.1	材料和方法	96
5.2.2	材料和方法	96
5.2.3	讨论	99
5.3	喹胺醇对小鼠细胞免疫活性因子水平的影响	100
5.3.1	材料和方法	100
5.3.2	结果	101
5.3.2	讨论	103
第六章	结 论	105
6.1	喹胺醇药代动力学与排泄研究	105
6.2	喹胺醇对肝细胞色素 P450 及其亚型基因表达和同工酶活性影响	105
6.3	喹胺醇对机体自由基代谢的影响	105
6.4	喹胺醇对细胞免疫活性因子影响和组织病理学观察	105
6.5	潜在毒性评价	106
参考文献:	107
致 谢	116
作者简介	117

第一章 前言

1.1 研究背景、目的和意义

1.1.1 研究背景

随着畜禽集约化、规模化现代养殖业的迅速发展,兽医兽药技术和产业化滞后与畜牧业生产扩大化间的矛盾日益明显,疫病已经成为影响畜牧业发展的主要因素。现阶段,动物疾病呈多样化和复杂化发展趋势,但疾病的预防和治疗性药物不尽如人意,抗生素和一些化学合成药物的用量仍在逐年增加,滥用抗生素和激素类药物的现象屡见不鲜,细菌耐药性和药物残留问题已成为影响我国畜产品品质和阻碍畜牧产业化发展的主要因素之一(刘维华,2006)。我国加入WTO以后,国际市场准入制度已为我国畜产品国际贸易提高了门槛,欧盟和日本等国家相继推行HACCP标准,畜产品贸易摩擦时有发生。一些兽用的结构性药物如喹诺酮、抗生素如氯霉素等由于残留或与人用药结构相类似,因此被限制应用。中兽药虽然在治疗动物疾病、饲料添加剂和无公害化畜产品生产中具有一定作用,但现代化程度低、产品不足,所以在兽药市场占有率很有限,难以在动物疾病群体防治中起主导作用。所以,抗生素或化学合成药物仍然是目前疾病预防和治疗的首选产品。有鉴于此,研制和开发高效、低毒、低残留、不产生耐药性的新型抗菌药和动物专用保健药品,研制低毒、低残留的非营养性药物添加剂,对改善我国畜产品品质、提高国际市场竞争能力,保证动物源性食品安全方面具有重要意义(陈贵才,2005)。

喹胺醇是中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所经过多年潜心研究,多次临床试验而研制成功的一种新型兽用合成药,其母体结构为对二氮杂萘-N, N'-二氧化物类,与卡巴氧、喹乙醇、痢菌净、喹烯酮等一样均属喹啉类不同侧链结构的衍生化合物(Carta A, 2005; 李剑勇,2004)。喹胺醇具有喹啉类化合物的抗菌活性和促生长功效,其抗菌谱较广,对大肠杆菌、沙门氏杆菌等革兰氏阴性菌所致肠道病如腹泻等均有较好的预防和治疗作用(周丽霞,1998; 张力,1998)。前期研究结果显示,喹胺醇的毒性和残留优于同类药物添加剂喹乙醇等,因此有望成为喹乙醇的良好替代品。喹胺醇作为一种创新药物,阐述其药代动力学、深入研究毒理和潜在毒性作用,对指导临床合理用药,保证动物源性食品安全生产和保障人类健康非常重要。

药物代谢动力学(Pharmacokinetics)、药效学(Pharmacodynamics)、药理学(Pharmacology)和毒理学(Toxicology),是现代药学的主要研究内容,也是新型药物设计、研制、开发、评估和临床监测的重要指标。药物代谢动力学是定量描述与概括药物通过各种途径进入体内后的吸收、分布、代谢和排泄过程及其动态规律。药物质量标准的制定,快速、灵敏、准确的残留检测方法建立都以药代动力学为基础;一种新药的研究、研制、开发、生产到临床应用,也离不开药代动力学的指导。现代物理学、化学、生物学理论与技术的发展,在仪器和方法等方面大大丰富了药代动力学的研究手段,并推动了药代动力学的发展,从而使药动学研究渗透到其它各学科领域。

药物在机体内的代谢是在许多酶参与下完成的,其代谢过程由两相组成:即I相和II相。I相代谢酶由混合功能酶系如细胞色素P450酶(CYP450)等组成,主要催化药物的氧化或还原反应,在药物的活化过程中起关键作用,并为II相代谢打基础,是多数药物在机体内代谢限速酶(如CYP450

等)(Coon MJ, 1992); II相代谢酶由葡萄糖醛酸转移酶、谷胱甘肽转移酶等组成,主要负责药物的结合反应,从而有利于药物或毒物的排出,在解毒过程中具有重要意义,如谷胱甘肽硫转酶(GST)等。CYP450同工酶如CYP1A1、CYP2E1等基因多态性与许多肿瘤和癌症有关,而外源性药物对这些酶可能起诱导或抑制作用。所以,分析药物代谢酶的变化,有助于药物毒理学阐述和代谢转化分析,是人药III期临床的研究内容之一。研究药物代谢酶及其催化反应,有利于指导药物的结构改进,以获得高效长效的可能子代新药,如络活喜就是硝苯啶的代谢产物(Liu, 1997)。

自由基(Free radicals)在机体内的生物学作用,是近年来生命科学研究的热点。许多外源性化学物质进入机体后,会对抗氧化机能产生一定影响,如引起抗氧化酶(如SOD、GSH-Px、CAT等)组成的抗氧化体系紊乱,从而导致自由基水平升高,并有可能诱发病害(Oxidative stress),从而使组织、细胞或生物大分子物质如蛋白质、DNA等发生氧化损伤(Oxidative injury)(李建喜,2006)。因此,有人提出脂质过氧化和自由基可以作为评价药物潜在毒性作用的一个重要方面。研究认为,多数抗菌药物的抗菌机理可能与自由基代谢有关,炎症等过程中白细胞暴发产生的自由基等,进入细菌或与细菌相互作用后,可与细菌DNA或蛋白质形成加合物,进而导致其变性或降解,从而起到杀菌作用。喹胺醇属喹喔啉结构衍生物,抗菌机理是致细菌DNA损伤(梁剑平,2001),该过程可能与其形成自由基有关。喹胺醇是否能引起机体组织氧损伤,至今未见相关材料报道。因此,研究喹胺醇对机体抗氧化机能的影响具有重要意义。

非特异性免疫在机体抵御病原入侵、维持自身内环境稳定方面具有重要作用。外源性药物进入机体后,均与蛋白质有不同程度的结合性,结合后可能会改变蛋白质的抗原性而形成异物,被免疫系统所识别,或引起免疫因子或细胞因子的变化(孙雷,2003)。近年来,阐述药物或添加剂对动物免疫机能的影响,越来越受人们的关注和重视。1984年,国际化学安全规划委员会(IPCS)和欧共体(CEC)共同组织了题为“免疫系统是毒损伤的靶”的研讨会,此次会议第一次提出了免疫毒理学(Immunotoxicology)的概念。免疫毒理学是毒理学的分支学科,它的主要任务是研究化学物质或药物与免疫系统相互作用,借助于试验动物,检测和评估化学物质或药物引起免疫系统的不良反应,在器官、细胞、分子水平上分析和阐述药物对其影响的一门学科。由此可见,阐述药物尤其是抗菌药物对机体免疫机能的影响,在药物潜在毒性安全评价中具有重要作用。

综上所述,药物代谢动力学是阐述药物体内过程的常规研究项目,是指导临床用药的科学依据。喹胺醇作为一种创新药,对其临床药物代谢动力学和体内排泄研究非常重要和必要。同时,阐述喹胺醇对机体抗氧化机能的影响、对免疫功能调控作用,有利于在药效学和药理学方面更深层次的解释其作用机理,并对药物的毒性作用做出正确评价,进而为指导临床合理、安全使用该药奠定基础。

1.1.2 本研究的目的是意义

喹胺醇作为一种新型抗菌促生长的兽用产品,其毒性作用、残留均优于其它同类药物,而促生长作用比喹乙醇等显著。所以,全面研究喹胺醇药理和毒理学,一方面可为我国创新性兽用药物提供新型候选药物,也可为该药申报国家一类新药提供参考数据和方法,并为合理生产和临床安全应用提供科学依据;另一方面在保证动物源性食品安全,保障人类健康方面具有重要意义。本研究拟以现代药理学理论和药物分析技术,阐述喹胺醇在靶动物体内的代谢过程和排泄途径;以

分子生物学和酶学方法, 分析喹胺醇对机体细胞色素P450同工酶、抗氧化机能、自由基代谢和细胞因子的影响, 阐述药物的潜在毒性作用。旨在为临床合理使用喹胺醇提供科学指导, 为兽医药理或毒理学研究提供新思路, 为亚临床毒理学研究提供新方法, 并为动物源性食品安全生产提供新的技术保障和候选药物。

1.2 国内外研究进展

1.2.1 药物安全性评价的意义

近年来, 随着药理毒理学发展, 药物临床前评价(如药代动力学研究等)和药物潜在毒性作用研究显得越来越重要, 是指导临床合理用药的科学依据, 是确保动物源性食品安全生产的理论保障。随着兽医药物学和药理学的发展, 新兽药的研究已不仅仅是临床有效性和传统毒理学的研究, 现代药物研究技术已深入和渗透到兽医兽药的各个领域。加入 WTO 以后, 为了控制药品质量, 我国兽药研制、生产和经营等行业已全面推行“4P”规则, 即 GMP、GLP、GCP 和 GSP, 这也是确保一种新兽药安全应用于临床的必要条件。在畜牧业生产实践中, 使用一些抗菌性药物添加剂, 不但可起到控制疾病流行的可能, 还有提高畜牧业产值的效果。但是, 这些抗菌药物的使用会导致药物残留和细菌抗药性问题。所以, 近年来部分国家已经纷纷采取限制措施。目前, 我国对该类药物的使用也有严格规定。但是, 由于我国兽医兽药法规不够健全, 管理技术相对落后, 养殖企业数量大, 滥用抗菌药、抗生素、激素类药物的现象时有发生, 导致人类中毒“事件”也有报道, 如“瘦肉精事件”、鱼类的“氯霉素事件”等(张宏伟,2004)。另外, 有些兽用药物在动物体内有蓄积作用, 不可能在短期内出现中毒症状, 当蓄积量达一定程度后才会出现中毒现象, 有些甚至无明显症状, 但有潜在毒性作用。抗菌类等药物性添加剂在畜牧生产中仍大量使用, 部分养殖户在经济利益的驱使下, 甚至滥用药物类添加剂的现象屡见不鲜, 给人民的生命和健康造成了巨大威胁。抗菌类药物如抗生素、磺胺类、喹诺酮类、喹喔啉类等则是常见的饲料药物添加剂, 这些药物的过量使用或滥用均会导致耐药性问题和药物残留问题。这会直接影响动物疾病的预防和治疗, 影响动物的正常生理功能的发挥如导致胃肠道正常菌群的改变, 导致药物敏感菌基因突变等。研究发现, 这类药物的过量使用还会影响到机体免疫机能的正常发挥, 如免疫抑制或免疫功能细胞或分子受损等。所以, 全面阐述药物的毒理学作用, 对药物合理使用和保障人类健康具有重要意义。

1.2.2 饲料添加剂在畜牧业生产中的作用

饲料添加剂(animal feed additive)是全价饲料的技术核心, 也是饲料工业的四大支柱之一。随着畜牧业的发展, 集约化和规模化养殖模式已成国内外畜牧生产的主流模式, 各类饲料添加剂与能量饲料和蛋白饲料间的合理配合使用, 对促进动物生长发育、肥育、缩短饲养周期、提高饲料利用率、取得更大经济效益和社会效益不可或缺, 现阶段其在中国畜禽养殖业中的地位是不可替代的, 具有重大现实意义。近 20 年来, 我国畜牧养殖业发展较快, 其中猪肉、禽蛋等畜产品已在总量上跃居首位, 其它如牛肉、羊肉、牛奶等产量也在逐年增加, 添加剂在其中的作用功不可没。目前, 能用于畜牧养殖业的饲料添加剂种类很多, 有中草药类饲料添加剂、微生态制剂、肽类制

剂和化学合成类药物性添加剂等。近几年,随着食品“绿色”化、无“公害”化和“有机”化浪潮的到来与发展,随着人们保健意识和环保意识的增强,中草药饲料添加剂、微生态制剂、肽类制剂逐渐成为广大养殖户和消费者所追求的添加剂产品,国内外许多国家已投入了大量的人力、物力和财力,研究和开发这类添加剂的新类型和新制剂。但总体而言,我国畜牧养殖业还处于发展初期,由于我国地域辽阔,城乡发展差距较大,各地养殖情况层次不齐。所以,饲料添加剂的使用方面也是情况各异,药物类添加剂在家畜养殖业中所占比例仍很大。

1.2.3 抗菌促生长类药物添加剂

1.2.3.1 抗菌药发展概况

抗菌药是指对病原菌有抑制和杀灭作用,可防治动物和人发生全身性感染的一类化学合成药或提取药,但目前仍主要是指化学合成类药物。最早出现并应用于临床的抗菌药是磺胺药(sulfonamide),1935年至今仍在应用(Peter ball, 2000; Smith CL, 2000),随着药物合成技术的发展,该类药在品种上和药效上有不断更新,如现用的复方磺胺甲噁唑、磺胺嘧啶、甲氧苄啶等仍在抗感染药物中占一定地位。20世纪40年代出现了呋喃类药,也是一类合成性抗菌药,应用比较广泛。另一类应用较多的抗菌药是80年代合成应用最广的药物——喹诺酮类,随着临床使用,其在结构上也有不断更新,品种亦很多,目前动物专用的品种有恩诺沙星、达诺沙星、沙拉沙星等,前景十分广阔(Labro MT, 2000)。1940年青霉素的研究和使用开创了抗生素抗感染的新纪元。通过不同菌种的筛选研究,以后陆续出现了不同结构和性能的抗生素(如链霉素、氯霉素、土霉素、红霉素、卡那霉素、林可霉素等)。1959年后从青霉素和头孢菌素中先后分离到母核6APA和7ACA,这为 β -内酰胺类抗生素的半合成提供了必要基础,后来就出现了许多新品种(如氨苄西林、阿莫西林、头孢氨苄、头孢噻吩等),尤以头孢菌素类为最多,临床疗效也最为突出。此后,通过其他类别抗生素的结构改造,制成了一些抗菌活性强和药理性能好的半合成品种,如氨基糖苷类的阿米卡星,四环素类的多西环素及大环内酯类的罗红霉素等。对少数结构不复杂的抗生素如氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考、磷霉素等已用全化学合成法替代发酵法进行生产(张治平, 2004)。

1.2.3.2 兽用抗菌类药物

据统计,我国1987~1998年研制的兽用抗菌药有67种,占化学合成类药物总量的45.8%。10多年来我国研制成功的二类以上兽用抗菌药有安普霉素、氟苯尼考、乙酰甲喹、喹乙醇、恩诺沙星、达诺沙星、二氟沙星、沙拉沙星等,除乙酰甲喹外,均为仿制药物。国外于1990~2000年新上市抗菌药15种,其中头孢菌素类4种,喹诺酮类6种,氯霉素类1种,大环内酯类1种,另有巴喹普林(Baquiloprim)、吡利霉素(Pirlimycin)、喔尼妙林(Valnemulin)3种。还有12种抗菌药复方制剂,是以下抗生素不同的组合,如新生霉素、青霉素、巴喹普林、巴喹鲁林、磺胺二甲氧嘧啶、阿莫西林、克拉维酸、甲硝唑、螺旋霉素、制霉菌素、新霉素、氨苄西林、舒巴坦、泰乐菌素、土霉素、阿莫西林、林可霉素、恩诺沙星SD银、奥比沙星、硝酸咪康唑、丙酮缩去炎松。随着我国兽药事业的发展,也涌现出了一批新的抗菌药如喹烯酮,作为一类兽用新药已通过国家审批和鉴定,并投入生产和临床应用(陈杖榴, 2004; 徐士新, 2001; 刘聚祥, 2001)。

磺胺类抗菌药(sulfonamides, SAs)是一类最早应用的合成性抗菌药物。20世纪80年代以来,虽然研制的新产品不多,但在生产和应用上仍居重要位置,《中国兽药典》收录了6种该类药物。

美国对泌乳牛禁用除磺胺二甲氧嘧啶、磺胺溴甲嘧啶、磺胺乙氧嘧啶以外的磺胺；日本也将磺胺甲基嘧啶、磺胺二甲嘧啶和磺胺-6-甲氧嘧啶列为动物性食品的重点监控兽药。我国以及美国、欧盟等国家规定了动物性食品中总磺胺以及单个磺胺的最高残留限量(MRLs)为 0.1mg/kg, 其中磺胺二甲氧嘧啶(SM2)的 MRLs 为 0.025 μ g/ml (Smith CL, 2000; Burkhardt, 2002)。

喹诺酮(quinolone)类是兽用另一大类杀菌性药物 (Peter ball, 2000; Ronald AR, 2003)。第一代萘啶酸(Nalidixic acid)和吡咯酸(Piromidic acid), 只对部分革兰氏阴性杆菌如大肠杆菌、沙门氏菌属、志贺氏菌属、克雷伯氏菌属、变形杆菌属有抗菌作用, 而对绿脓杆菌、葡萄球菌均无效, 因内服吸收差, 且疗效不佳, 现已少用。第二代药物为吡哌酸(Pipemidic acid)和噁啉酸(Oxolinic acid), 国外还有新噁啉酸(Cinoxacin)和甲氧噁啉酸(Miloxacin)。均在抗菌谱上有新扩大, 但抗绿脓杆菌的活性不高, 葡萄球菌等革兰氏阳性球菌对之仍然耐药。自 1979 年合成诺氟沙星后, 出现了众多含氟喹诺酮类药物, 使喹诺酮类步入第三代, 在临床上逐渐取代了第二代药物。第三代属氟喹诺酮类, 其特点是: ①抗菌谱扩大, 除进一步加强革兰氏阴性菌的作用外, 还对革兰氏阳性球菌、支原体属、衣原体属、分支杆菌属等有相当活性; ②对细胞、组织的穿透力增强, 使之内服易吸收, 体内分布广。由此已成为一类有良好前景的抗菌药。据统计 1990 年各国应用 7 种, 除诺氟沙星外还有培氟沙星、环丙沙星、依诺沙星、氧氟沙星、洛美沙星与托氟沙星。其中以环丙沙星的抗菌活性最佳, 托氟沙星抗革兰氏阳性菌活性最强。上世纪 90 年代(1991~1997 年)上市 9 种新氟喹诺酮, 均各具特色, 例如司帕沙星的抗葡萄球菌、肺炎球菌、支原体、衣原体、分支杆菌的活性在同类药中最强, 左氧氟沙星的抗菌作用比氧氟沙星强一倍, 不良反应少等。目前各国竞相开发的新喹诺酮约有 50 种, 研究主要致力于: ①增强抗革兰氏阳性菌活性; ②改善药动学性能, 提高生物利用度; ③提高安全性; ④探索新的活性结构; ⑤探索微生物产生的新喹诺酮; ⑥探索抗肿瘤与抗病毒药物; ⑦探索改善和解决耐药性问题(Gladek, 1989)。

1.2.4 兽用喹啉类药物

1.2.4.1 概述

喹啉类药物如卡巴氧(Carbadox)、喹乙醇(Olaquinox)、西吡氧(Cyadox)都是喹啉(Quinoxin)侧链取代衍生物, 母体结构为喹啉 1,4-二氧化物(quinoxaline-1,4-dioxide)(Suter W, 1978)。这类产品均具有提高饲料转化率、促进动物生长、广谱抗菌和抗球虫的作用, 曾是一种较好的非营养性药物饲料添加剂。最初作为猪、牛和家禽抗菌促生长添加剂使用, 为畜牧业生产创造了巨大的经济效益。但后期毒性试验表明, 喹啉具有致癌和光敏毒性作用, 所以, 它和卡巴氧都被限制作饲料添加剂, 70 年代中期已被淘汰。20 世纪 80 年代, 我国引进了喹乙醇(Olaquinoxin)合成技术, 并大量生产而作为促生长饲料添加剂应用, 曾一度取得了显著的经济效益。但近年研究发现, 喹乙醇作为饲料添加剂可能会在畜禽组织内蓄积, 并可能有弱的致突变作用。但是, 由于这类药具有抗菌和促生长效果, 所以研制低毒低残留的同类新型结构药物, 是近年来国内兽药创新点之一。因此, 有许多类似产品如痢菌净(乙酰甲喹)、喹烯酮、喹胺醇和喹赛多等的报道, 其中喹烯酮已取得我国一类新兽药证书, 并投入生产和临床应用。

1.2.4.2 喹乙醇

喹乙醇(Olaquinox), 又称倍育诺(Bagonox), 化学名为 2-CN-(2-羟基-乙基)氨基甲

酰-3-甲基-喹噁啉-1,4-二氧化物。是 20 世纪 80 年代我国引进的一类化学合成药, 其对革兰氏菌、猪痢疾密螺旋体均有一定抑制作用。内服吸收迅速, 体内分布广泛, 生物利用度较高, 肝中的药物残留期长, 主要在尿中排出。由于喹乙醇作为饲料添加剂会在畜禽组织内蓄积, 因此, 欧盟、美国等已限制作为饲料添加剂应用。我国农业部 2003 年对喹乙醇的使用作出了新的规定, 不能作为鸡饲料添加剂, 只能使用于 35kg 体重以前仔猪, 每 1000kg 饲料猪 50~100g, 不可加大剂量, 并规定宰前 35d 停药(孙永学, 1998;曾振灵, 1995; Sørensen AH, 2003)。

1.2.4.3 乙酰甲喹

乙酰甲喹(Mequinox)又称痢菌净, 化学名为 3-甲基-2-乙酰基-N-1,4-二氧喹噁啉, 是一种广谱抗菌药, 对多杀性巴氏杆菌、大肠杆菌、沙门氏杆菌、李氏杆菌的抑菌作用强, 对密螺旋体有特效。该药最初由中国农业科学院原中兽医研究所在 80 年代研制而成, 1992 年载入《中国兽药规范》一部, 后在国内大面积推广应用(袁群英, 1996)。主要用于肠道感染所致的痢疾和肠炎等疾病, 其抗菌机理和其它喹噁啉类药物一样, 都是对敏感菌体的脱氧核糖核酸(DNA)合成起抑制作用。对家禽的肠道感染、猪的细菌性肠炎特别是密螺旋体所致猪血痢和白痢有很好的抑制作用。另外, 试验发现该药对犊牛副伤寒、各类家畜肠炎型腹泻、禽霍乱、雏鸡白痢、伤寒、大肠杆菌病以及兔细菌性肠炎等均具有良好的治疗和预防效果。试验表明, 痢菌净对鱼类胃肠性炎症亦有抑制效果。后期实验发现, 如果该药长期或大量使用, 会导致敏感菌产生一定的耐药性, 并导致机体出现中毒现象。有人建议, 为了保持其疗效并降低其用量, 可将痢菌净与黄连素配伍使用, 无论在体外的抑菌试验还是临床病例治疗, 均可获得较为满意的效果。有人将痢菌净按 2500g/100kg 饲料添加, 对猪、羊、牛、马等肠道炎症有很好的预防作用; 为确保饲料安全, 添加量定为 1500g/100kg, 该剂量对预防大肠杆菌等引起的痢疾较为理想(何祖健, 2001;张丰景, 1998)。

1.2.4.4 喹烯酮

喹烯酮也是喹噁啉-1,4-二氧化物类抗菌药, 由中国农业科学院原中兽医研究所在 90 年代研究而成的一种动物专用添加药物, 抗菌谱较广, 与同类其它药物相比其促生长作用更好。临床试验表明, 在饲料中添加微量“喹烯酮”, 对猪、鸡具有防病作用和促生长功效, 还能提高饲料利用率。急性毒性、蓄积毒性及亚急性毒性试验结果表明, 50mg/kg、75 mg/kg、100 mg/kg、150 mg/kg、300 mg/kg 添加在饲料中, 均不会出现任何毒副反应。药代动力学和药物残留与消除试验表明, 猪鸡对该药的吸收和消除较快, 生物利用度相对较低(李剑勇, 2006)。

1.2.4.5 喹胺醇

喹胺醇是由中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所在 20 世纪 90 年代后期研制而成, 其母体结构亦为对二氮杂萘 N, N'-1,4-二氧化物类, 是一种新型抗菌类药物饲料添加剂, 具有喹噁啉类化合物的抗菌活性和促生长作用 (梁剑平, 2001)。其毒性远低于同类药物饲料添加剂喹乙醇, 是喹乙醇的良好替代品。试验表明, 小白鼠的 LD50 为 9000mg/kg、肉仔鸡的 LD50 为 4949mg/kg。抑菌试验表明, 对大肠杆菌、沙门氏菌等的抑菌效果最为明显。临床试验发现, 对仔鸡白痢、仔猪黄痢的预防效果比喹乙醇要高出 15~20 个百分点, 并对仔猪的体增重和饲料利用率均有促进和提高的效果。残留试验表明, 75mg/kg 体重连续饲喂肉仔鸡 6d, 最后一次给药后的 24h, 肝、肾组织内均已用 HPLC 检测不到喹胺醇原药的存在(曹香林, 2005;周丽霞, 2000)。

1.2.5 药代动力学研究

药物代谢动力学(Pharmacokinetics)又称药动学,属应用动力学(Kinetics)原理与数学模式。药动学是定量描述与概括药物通过各种途径(静脉注射,静脉滴注,口服给药,或其它用药方式等)进入体内后的吸收(Absorption)、分布(Distribution)、代谢(Metabolism)和排泄(Elimination),即A, D, M, E过程的“量时”化或“血药浓度经时”化的变化过程及其动态规律的一门学科。主要描述机体内的药物与时间对应的曲线或机体内代谢物的浓度随时间变化的关系。目前,药代动力学研究方法主要有经典药动学方法、线性模型法、非房室分析法、放射标记测定法及生理模型法(王广基, 2005)。近20年来,物理学、化学、生物学理论与技术的快速发展,促进了药动学研究仪器、技术和方法的成熟,推动了药代动力学的发展。因此,药动学已渗透到生物药剂学、临床药剂学、药物治疗学、临床药理学、分子药理学、生物化学、分析化学、药剂学、药理学及毒理学等多学科领域。药代动力学研究在指导新药临床应用、药物作用机理研究、新药研制和开发等方面的作用和重要性日趋明显,它是新药设计、新剂型研制、中毒预防、药物残留分析与检测、最优给药方案设计等的重要理论依据(冯淇辉, 1987; 邓树海, 1992)。喹胺醇作为一种新型抗菌促生长药,对其抗菌、促进生长、毒理学和残留已做了初步研究。药代动力学、体内外药物代谢试验和特殊毒理学研究尚属空白,因此,这是该药现阶段研究的主要任务。

许多临床有效药物的发现都具有幸运和偶然因素,异烟肼是典型例证之一。早在1912年,Meyer和Mally等已合成了异烟肼(Liu, 1997),但直到1952年Robitzek在研究了该药的药代动力学和代谢之后,才证实了其抗结核作用。如消炎痛和布洛酚,当时由于缺乏其药代动力学和体内转化知识,因而其抗风湿性能迟迟未被发现(Shen TY, 1972; Adams SS, 1976)。参考药物动力学参数,了解药物体内代谢过程,分析药物结构对代谢和药动学参数的影响,从中找出规律,再用以指导新化合物设计,就能发挥药物动力学和代谢对新药设计的指导作用。如巴比妥类药物,其结构轻微的改变,就可显著影响药物体内过程,从而导致药物作用效果的改变。药物动力学和代谢研究,不仅可求得这些药物的动力学参数,而且便于进行定量的比较,从而分析药物的代谢过程和作用效果的差异。如邻苯甲异噁唑青霉素与双氯苯甲异噁唑青霉素,结构差别只在氯原子的取代数量上,但临床应用发现,二者口服剂量相等的情况下,双氯苯甲异噁唑青霉素的血药浓度是邻苯甲异噁唑青霉素的2倍(Wise R, 2002)。后来分析认为,这种差别主要是因消除速率不同而引起。药物成败的关键与药代动力学非常重要,如半衰期过长或过短、吸收性差、一级代谢物较多,均会不利于药物效应的发挥。Prentis等(1988)^[40]报道了人用319种新药,其中198种因药代动力学问题而不能应用于临床(Prentis, 1998)。可见,药代动力学数据准确性和药物代谢对药物设计非常重要。

1.2.6 细胞色素 P450 酶在新药研究中的作用

药物代谢研究离不开药物代谢酶的分析,催化外源性化合物在体内代谢的酶有两大类:I相酶和II相酶。I相代谢酶以细胞色素P450单加氧酶(monooxygenases)和环氧化水解酶(epoxide hydrolase)为主;II相代谢酶则有:UDP-葡萄糖醛酸转移酶(UDP-glucuronyl transferases)、乙酰转移酶(acetyl transferases)、硫转移酶(sulfotransferase)、谷胱甘肽转移酶、磺基转移酶等(夏世

钧, 2001)。近年来, CYP 450酶的研究在动植物等领域中的研究非常活跃, 已形成一支独立的学科, 即CYP450酶学。CYP 450酶在药物体内代谢过程中发挥着重要作用, 该酶一直是药物代谢研究热点, 它在新药的研究和开发中起重要作用。药物作用的个体差异可能与该酶的基因多态性 (Genetic polymorphism) 有关, 人类该酶具有750个成员的超家族。CYP 450的基因多态性决定着药物代谢的种族和性别间的差异性。CYP 450酶是一种可诱导性酶, 很多化学异物 (包括药物) 能对其产生诱导或抑制作用, 机制不尽相同。研究认为, 肝脏CYP 450可被诱导的, 称为诱导性 (Inductive) CYP 450酶; 对诱导反应不敏感的, 称为构成性 (Constitutive) CYP 450。如药物代谢加速的经典诱导剂苯巴比妥, 可诱导CYP3A4。涉及调控大多数药物和外来物代谢的CYP450酶系的基因主要有3个系统, 即CYP1~3。研究认为, 代谢物活化与CYP1A有关, 也有人认为其在降低毒性方面有一定作用; CYP1A1很容易被香烟中的前致癌物多环芳烃活化。另据报道, 许多物质的纯代谢率与CYP 3A5和CYP 3A4有关, 这被称之为CYP3A代谢途径。由此可见, 分析和检测代谢酶是药物体内生物转化研究的重要内容 (冷欣夫, 2001)。

1.2.6.1 CYP1A1

CYP1A1属CYP1A基因家族成员, 是目前研究最多、最为深入的CYP同工酶之一。流行病学调查研究发现, CYP1A1在许多癌症 (如肺癌、胃癌、乳腺癌等) 发病学中有一定作用, 因此其被认为是一种致癌作用的潜在性指标 (Masson LF, 2005, Kisselev P, 2005)。如当环境毒物多环芳烃 (polycyclic aromatic hydrocarbon, PAHs)、多氯代二苯并二噁英 (Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, PCDDs)、TCDD、多氯联苯 (polychlorinated biphenyls, PBs)、黄曲霉素B1 (aflatoxin B1) 等进入机体或加入体外培养的细胞基中后, 在CYP1A1的催化作用下发生环化反应, 形成环氧化物 (epoxide), 并可能攻击大分子物质如蛋白质、核酸等而致毒 (Adam T, 1998)。因此, 研究药物对机体CYP1A1的影响, 对药物或毒物的安全性评价中有重要意义。

1.2.6.2 CYP2E

目前在人和大鼠 CYP2E 基因家族中, 只发现了 CYP2E1 一个家族成员, 而且非常相似 (Wrighton, 1986)。CYP2E1 主在分布于肝, 但肾、脑、肠等组织中均有 CYP2E1 (Ingelman-Sundberg M, 1988; Neve EP, 1999)。CYP2E1 的生物学意义在毒理学和毒物代谢方面。CYP2E1 参与了许多毒性物质或药物的动员和活化, 如乙醇、四氯化碳、对乙酰氨基酚、一些潜在性致癌物如亚硝酸胺等, 这些物质被动员或活化后, 发生代谢转化, 毒性会更强。体内、外试验研究发现, CYP2E1 诱导物具有协同作用, 会导致毒性作用增大; 如果有 CYP2E1 抑制剂存在时, 诱导物的毒性作用会减弱。CYP2E1 除其在毒理学方面的意义外, 还可在某些病理过程中发挥积极作用, 如马洛里小体 (Mallory body, MB) 是慢性肝病的一种病理变化, CYP2E1 水平升高后会降低 MB 的发生率, 并有利于肝病好转 (Bardag-Gorce F, 2005), 这可能与该酶能促进毒物代谢有关 (Girre C, 1994)。CYP2E1 的诱导因素是多方面的, 可以归纳为以下几点: (1) 药物性诱导, 如上述底物作用后, CYP2E1 的表达会上调; (2) 营养因素, 如饲料中脂肪含量过高碳水化合物含量低时, CYP2E1 的水平也会升高; (3) 病理性作用, 如糖尿病 (Woodcroft KJ, 2002); (4) 生理紊乱性作用, 如垂体切除、三碘甲状腺氨酸过高时, CYP2E1 mRNA 水平也会升高 (Hong JY, 1990)。目前, 已公认的 CYP2E1 抑制剂为二巯化四乙基秋蓝姆 (夏世钧, 2001); 另外有报道, 培养的乳鼠肝细胞中胰高血糖素 (glucagon) 会降低 CYP2E1 的水平 (Eliasson E, 1992)。

1.2.6.3 CYP3A1

CYP3A 是 CYP3 家族成员之一类, CYP3A1 属 3A 亚族。大鼠 CYP3A1 基因组约有 1700bp (Gen bank: M86850.1 GI:205919), 该类酶在许多临床药理、毒理学和药物代谢方面具有重要意义, 参与药物的首过效应和药物相互作用 (Ma Y, 2004)。目前, 已被鉴定的大鼠 CYP3A 基因有: CYP3A1、CYP3A2、CYP3A9、CYP3A18、CYP3A23、and CYP3A62 (Matsubara, 2004)。大鼠 CYP3A1 和 CYP3A2 的基因组有 90% 的同源性、而辅基蛋白也有 89% 的同源性 (Gonzalez, 1986)。CYP3A1 既能被多种化合物所诱导, 也能被多种化合物所抑制。如大鼠体内或培养细胞中 16 α -孕烯(甾)酮醇 (pregnenolone-16 α -carbonitrile, PCN) 过量时, 大鼠肝脏 CYP3A1 mRNA 会大量表达, 表明 PCN 能诱导 CYP3A1 (Meredith. C, 2003), 该物质实际上也是该酶的典型诱导剂。抗癌药物紫杉醇、多西塔塞、紫杉烷等也可诱导大鼠、人等肝细胞或体外培养细胞中 CYP3A1、CYP3A2 的大量表达 (Gut I, 2006), 这有助于药物的抗癌作用。奥美沙星进入机体后, 其主要 I 相代谢酶就是 CYP3A1, 该药也会诱导 CYP3A1 的表达 (Lee DY, 2006)。利福霉素是临床上常用的抗结核药, 也能诱导人或鼠的 CYP3A1 mRNA 的表达 (Morioka Y, 2006)。对 CYP3A1 抑制作用药物近年来也报道了很多。环孢素 A (cyclosporin A, CsA) 和盐酸小檗碱 (berberine chloride, Ber) 在人器官移植后可以作为免疫抑制药物和治疗腹泻的药物, 试验发现当这两种药物同时使用后, 会导致小鼠肝细胞中 CYP3A1 mRNA 水平的下降, 表明药物对该酶的抑制作用, 从而可以延长药物在体内作用时间, 有利于药效的最大程度发挥 (辛华雯, 2004)。酮康唑是临床上用于抗真菌的药物, 它对小鼠 CYP3A1 mRNA 的表达也有抑制作用 (余爱华, 2004)。另外, 据报道随年龄的增加, 试验动物肝细胞 CYP3A1 mRNA 也会逐渐下降, 说明衰老对该酶也有抑制效果或促进降解的作用 (Day KC, 2006)。虽然对 CYP3A1 的诱导物或抑制剂作了大量研究很多, 但目前对 CYP3A1 的诱导和抑制机制尚不清楚。

1.2.7 自由基在动物体内的生物学作用

自 Comberg (1900) 提出有机自由基 (Organic Free Radical) 以来, 有关自由基在生命体系中生物学作用的研究相继开展了很多 (方允中, 1998)。1956 年, Harman 等发现放射线诱导突变和诱发肿瘤的发病机理与自由基有关, 该研究是自由基医学 (Free Radical Medicine) 史上的里程碑。1968 年, McCord 和 Fridovich 报道了超氧化物歧化酶 SOD 抗氧化的生物学作用, 从而开创了自由基生物学的新篇章。自由基是机体内的一种不可缺少的活性元素, 对生物体既有益又有害。正常情况下, 生物体内有一套完整的抗氧化体系, 可以维持自由基的代谢平衡。但是, 当机体在某些疾病或外源性物质入侵后, 自由基代谢可能会发生异常, 从而诱发脂质过氧化反应, 并可能导致组织细胞发生氧应激性损伤 (赵克然, 2000; Djordjevic VB, 2004; Valavanidis A, 2006)。近 20 年来, 脂质过氧化和氧应激一直是生命科学研究的热点, 在许多病理或异常生理情况下, 都会因大量自由基的产生而对机体造成损伤。CYP 450 酶系参与机体氧化还原反应, 它与 NADPH 等都会在机体内产生大量活性氧 (Reactive oxidative species, ROS)。有报道, 喹乙醇会降低机体抗氧化酶活力, 增加脂质过氧化物含量, 并指出可能与氧应激有关。有些化学物质进入机体后, 在 CYP450 酶的作用下, 开成亲电子化合物, 进而与 DNA 形成加合物, 导致机体正常生理功能改变, 甚至发生疾病, 如黄曲霉毒素中毒, 是因为亲电性环氧化物形成所致。Sato K 等 (1992) 对不同的喹啉类化合物, 在体外诱导 CYP 450 还原酶和 NADPH 产生 $O_2^{\cdot-}$ 做了比较研究, 结果表明,

这类物质确能引起自由基的生成。JJ Inbaraj 等 (2003) 报道, TPZ、TPZCN 和喹啉啉是喹啉啉类衍生物, 均能引起光毒性作用, 其损伤 DNA 的机制可能与单线态氧形成有关 ($^1\text{O}_2$)。JJ Inbaraj 等 (2002) 报道, 喹啉啉类化合物能引起鼠的 DNA 加合物的形成, 这可能与该类药物导致活性氧生成有关。

1.2.7.1 机体内的活性氧自由基及其性质

自由基(Free Radicals, FRs)是指带不成对电子的原子、分子、离子或原子团。自由基的种类很多, 研究较多的有以氧(O)、碳(C)、氮(N)为中心的活性基团, 其中对活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)及其产物的研究最为活跃, 其占机体内总自由基的 95% 以上。自由基的形成有三种方式 (赵克然, 2002): (1)共价键的均裂; (2)单电子丢失; (3)单电子获得。机体内电子传递是自由基形成最普遍最易发生的途径; 如高温、紫外线 (UV) 照射或电子辐射作用, 也能导致分子裂解后会形成自由基。生物体内自由基形成的机理非常复杂。氧化呼吸链是机体赖以存在的基础, 其中有多次分级电子传递, O_2 是电子受体, 所以会形成多种活性氧自由基, 如 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot\text{OH}$ 、 HO_2^{\cdot} 、 H_2O_2 、 $^1\text{O}_2$ 等。在活性氧的作用下, 组织细胞会因脂质过氧化 (LPO) 而产生许多脂自由基如 L^{\cdot} 、 LO^{\cdot} 、 LOO^{\cdot} 、 LOOH (Valdez LB, 2000)。外源性化合物进入机体后, 也可能导致大量自由基生成, 如肾上腺素、 CCl_4 和乙醇等会诱导机体产生 CCl_3^{\cdot} 和 $\cdot\text{OH}$ 等自由基。机体内生物活性物质代谢异常后, 也会导致自由基水平升高, 如细胞内硫醇 (thiol) 和对苯二酚等小分子物质发生自氧化反应, 或蛋白酶 (如黄嘌呤氧化酶) 等的催化反应中, 都会生成自由基 (Ghezzi P, 2005)。另外, 如炎症等病变过程中, 白细胞发生呼吸爆发 (Respiratory burst) 后, 机体内 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot\text{OH}$ 水平会明显升高。动物体内硒等微量元素缺乏时, 自由基水平也会升高。自由基典型物理性质是顺磁性 (Paramagnetism), 因此可以用电子自旋共振技术 (Electron spin resonance, ESR) 对组织内的自由基进行直接检测。由于自由基外层具有奇数价电子, 因此其化学性质非常活泼, 它既是电子供体又是电子受体。

1.2.7.2 活性氧自由基对组织的损伤

1.2.7.2.1 生物膜损伤

生物膜是生命活动的基础, 主要由脂质、蛋白质和糖类组成, 脂质以磷脂为主, 磷脂的主要成分是多聚不饱和脂肪酸 (Polyunsaturated fatty acids, PUFAs), 其中有多数弱键和不饱和键, 自由基对其有很高的亲合力, 因此生物膜易受自由基攻击 (Sargis RM, 2006)。活性氧作用于生物膜后, PUFA 中 LH 会在 R $^{\cdot}$ 的作用下, 会启动 LPO 链式反应。但当 LPO 反应链遇到 SOD、GSH、 V_E 、 V_C 等抗氧化物、或产生损伤效应后就会终止 (Janisch KM, 2005)。红细胞膜发生 LPO 损伤后, 通透性会增加, 细胞变脆, 易发生溶血。分析认为, 这主要与红细胞膜含有丰富的 PUFAs、并与 O_2 接触机率高、以及循环中自由基的浓度相对较高等有关。在脂质过氧化产物中, 醛类 (Aldehydes) 所占比例较大, 其中丙二醛 (MDA) 被认为是 LPO 反应的代表性中间产物, 有人认为它不会对组织造成损伤; 也有人认为它与膜蛋白结合, 会导致膜通透性增加, 膜蛋白酶失活, 或膜上的受体和供体被破坏, 细胞代谢因此会发生紊乱 (Juranek I, 2005)。线粒体膜在 Fe^{2+} 、 Cu^+ 等作用下, 其附近的 H_2O_2 分解成 $\cdot\text{OH}$, 会导致膜肿胀甚至消失 (Calabrese V, 2005)。当微粒体、溶酶体发生 LPO 损伤后, 多聚核糖体会解聚、蛋白质合成可能被抑制。又如过氧化体膜组成发生 LPO 损伤后, 大量的 H_2O_2 被释放入血, 也会加剧细胞的氧化损伤 (Stadtman ER, 2003)。

1.2.7.2.2 蛋白质的损伤

蛋白质在细胞中分布广、比例大, 也是活性氧靶分子。如 His、Pro、Trp、Cys、Tyr 等是自

由基的敏感型受体, 自由基会使这些氨基酸残基发生突变, 蛋白多肽链也会随之断裂、聚合或交联, 蛋白质的构象和活性位点改变, 导致其功能的改变。又如 GSH-Px 等富含巯基(-SH)的酶, 活性氧使-SH 转变为-S-S-而失去活性。 O_2^- 可激活线粒体顺乌头酸酶, 并形成多量的 $\cdot OH$ (Jeannette VV, 2003)。蛋氨酸(Met)氧化损伤后, 一些抗蛋白酶如 α -抗胰蛋白酶会失活。活性氧自由基如 O_2^- 、 $\cdot OH$ 、 H_2O_2 、 $3\Sigma gO_3$ 共同作用于蛋白质的结果可能有以下四种: (1)疏水性的改变, 从而影响膜受体和配体等; (2)酶活性降低或增强; (3)免疫原性改变, 诱发自身免疫性疾病; (4)热应激蛋白如 HSP70 的大量表达, 导致特异性转录因子(如 HSF70)释放; (5)蛋白水解作用增强, 这也是细胞蛋白质氧化降解的标志 (Juranek I, 2005; Stadtman ER, 2003)。

1.2.7.2.3 核酸的损伤

多聚核苷酸也是活性氧和其它自由基攻击的靶分子。DNA 双螺旋外侧的嘌呤和嘧啶对自由基最为敏感, 被损伤后会导致碱基被修饰, 氢键断裂, 双链或单链也发生断裂。虽然 DNA 有强大的修复功能, 但修复后的突变率会升高, 有时也出现永久性破坏 (Melidou M, 2005)。氧应激时细胞内 Ca^{2+} 增多, 核苷酸因此会发生羟化反应, 从而导致细胞凋亡 (Apoptosis)。 Fe^{2+} 和 Cu^{+} 或其它过度金属离子可提高 H_2O_2 转化为 $\cdot OH$ 的速率, 从而间接地对 DNA 带来损伤。当 DNA 发生 LPO 损伤后, 会因基因突变可能导致癌症或遗传病。另外, DNA 损伤后, 会导致 ADP 核酸转移酶所依赖的 $NAD^+ / NADH$ 的丢失, 从而阻断其修复通路。线粒体由于和活性氧接触比较频繁, 而且缺乏修复功能, 所以它的 DNA 损伤率极高, 但修复率较低。肝微粒体发生氧损伤后, UDP-葡萄糖醛酸转移酶表达下降, 从而影响 DNA 的结构和功能。

1.2.7.3 机体对自由基的利用

前文提到活性氧是细胞生命活动不可缺少的活性物质。研究表明, 低剂量辅射增强机体免疫力的机理可能与自由基生成有关; 红斑狼疮患者, 在一定范围内机体的免疫机能会因自由基水平的上升而增强。自由基在体内的适量增多可提高部分酶的活力, 如核酸还原酶发挥作用时需自由基参与。自由基还参与机体内一些活性物质(如前列腺素、凝血酶原和胶原蛋白)的合成; 核苷酸的合成、肝脏的解毒过程中, 自由基可激活某些合成酶或解毒酶 (Valavanidis A, 2006; Valdez LB, 2006)。炎症过程中, 自由基可促进炎性细胞吞噬细菌或杀死细菌, 如中性粒细胞发生呼吸爆发时, 细菌会因自由基水平升高而逐渐消失。炎症过程中 MPO 和一些卤素作用能起到杀灭细菌的作用。NO 作为一种信号分子, 对神经系统的多种功能有调节作用。自由基能促进细胞内单加氧酶的活性, 进而使许多化学物质发生羟化反应而易于排泄。

1.2.7.4 抗氧化酶对自由基清除剂

酶既是自由基攻击的靶分子, 又是自由基的天然清除剂。当自由基水平升高时, SOD、CAT、GSH-Px、MPO、乳酸脱氢酶, 还有硫转移酶、肌酸激酶的活性都会或多或少发生变化 (赵克然, 2000; Valdez LB, 2000; Ghezzi P, 2005)。哺乳动物细胞内有两类 SOD, 一类为 Cu,Zn-SOD, 另一类为 Mn-SOD, 前者主要分布于细胞质中, 后者主要分布于线粒体内。SOD 在辐射、炎症、缺血再灌和实验性皮肤癌等病变过程中, 均有明显抗脂质过氧化作用。CAT 不但能阻止 H_2O_2 转变为 $\cdot OH$, 还能使之分解为 H_2O 和 O_2 , 这是 CAT 抗炎和抗 UV 照射损伤的机理。SOD 和 CAT 在脂质过氧化方面有协同作用。GSH-Px 也能催化 H_2O_2 的分解, 降低机体内 $\cdot OH$ 的水平。GSH-Px 有直接保护组织免受 LPO 损伤的作用, 其机理是可使 LOOH 分解, 从而保护生物膜。葡萄糖-6-磷酸脱氢酶能维持 NADPH 在体内清除活性氧的能力。乳酸脱氢酶和肌酸激酶也有抗氧化作用, 但机

理尚不清楚 (Jeannette VV, 2000)。

1.2.8 兽药的免疫毒理评价意义

药物对机体免疫机能的影响, 已逐渐成为人们关注的焦点, 尤其是药物对幼儿或幼年动物免疫系统发育的影响研究, 占药物毒理学研究的很大一部分, 免疫毒理学也逐渐成为毒理学研究的一个分支学科。免疫毒性作用往往没有明显临床症状, 是一种慢性毒性过程。以前药物毒理研究只注重急性毒性和有临床症状的慢性毒性试验, 对隐性毒作用并不重视。Julien van Grevenynghe 等 (2003) 报道, 多环芳烃 (PAH) 对动物有免疫抑制性损伤作用, 该化学物质能降低单核细胞分化为巨噬细胞和树突状细胞的能力。我们知道, 巨噬细胞是机体非特异性免疫系统的主要成员, 是清除外源性异物的先锋, 它和树突状细胞均是免疫系统中主要的抗原递呈细胞 (APC), 它们的损伤可能会影响到机体全身免疫系统功能的正常发挥。Holsapple MP 等 (2004) 综述了免疫毒理学研究在幼儿免疫系统发育中的重要性。Cederbrant K 等 (2003) 报道, NK 细胞活性的变化, 可以作为检测一种新药免疫毒作用的重要指标。Hastings KL (2002) 指出, 外源性抗生素也可能导致免疫系统损伤。外源性化学物质介导的免疫功能紊乱发生的可能机制有: (1) 药物导致造血功能、细胞免疫、体液免疫、非特异免疫改变, 从而引起免疫抑制, 抗病力减弱, 肿瘤形成等; (2) 药物所致抗原识别和敏感性的改变, 引起变态反应或自身免疫性疾病; (3) 炎症因子表达与分泌量的改变导致组织损伤或中毒。

1.2.8.1 NO 的生物学作用

自美国科学家发现一氧化氮 (Nitric oxide, NO) 是心血管系统中一种重要的生物信号递质以来, 它的各种生物学作用就成为人们研究的热点, 1992 年《Nature》杂志将 NO 评为明星分子, 1998 年 Robert F. Furchgott、Louis J. Ignarro、Ferid Murad 三位科学家因此而获得了医学生理学诺贝尔奖。机体内的 NO 是在一氧化氮合酶 (NO synthase, NOS) 的催化作用下, 由 L-精氨酸 (L-Arg) 转变为 L-瓜氨酸 (L-Cit) 的过程中产生的, 随即被扩散到周围组织中, 并发挥生物学作用。机体内 NO 的水平一般维持在一个平衡状态, 虽然有大量的 NO 在体内生成, 但是由于其生物半衰期很短, 仅有 5-6s 的时间, 因此很容易被氧化成 NO_2 , 然后以硝酸根 (NO_3^-) 和亚硝酸根 (NO_2^-) 离子的形式存在于细胞内外液中。目前认为, NO 的生物学作用有三方面: 一是细胞毒作用, 即当细菌、病毒或肿瘤细胞产生后, 会刺激机体内巨噬细胞产生大量的 NO, NO 会转变成自由基 ONOO, 该物质进入微生物或肿瘤细胞后, 与 DNA 结合或抑制 DNA 合成酶, 从而杀死病原微生物或肿瘤细胞; 二是神经递质作用, NO 作为一种生物信使物质, 在信号传导过程中有重要作用, 研究认为大脑的许多部位都有产生 NO 的能力, Moncada 等提出 NO 在哺乳动物的消化、生殖、呼吸、循环等系统的自主调节过程中有重要作用, 如嗅觉、痛觉等的信号传递就有 NO 的参与。近年来研究还发现, 成年动物体内的 NO 在兴奋性氨基酸引起的短期突触性效应和神经发育、学习、记忆等长期效应中也有重要作用; 三是心血管调节因子, Murad 等 (Murad, 1980) 报道, 血管平滑肌的舒张需要鸟苷环化酶 (guanylatecyclase, GC) 的活化, 从而使鸟苷 (guanosine 5'-triphosphate, GTP) 转化为环化的单磷酸鸟苷 [cyclicguanosine (3',5')-monophosphate, cGMP], NO 是 GC 活化的活性介质; Furchgott 等 (Furchgott, 1980) 在研究乙酰胆碱对血管平滑肌的舒张作用时, 发现 NO 作为一种“第二信使”在其中起着关键作用, 当时称之为“内皮舒张因子” (EDRF), 后来很多实验证实

EDRF 就是 NO。研究发现, NO 能够促进血管平滑肌松弛, 并可抑制血小板凝集和黏附于内皮细胞, 从而调节血压。

催化和调节机体内 NO 生物合成的酶有三类: 神经型 NOS (nNOS)、内皮型 (eNOS) 和诱导型(iNOS), 这三种酶分别存在于神经、血管内皮和免疫细胞如巨噬细胞等组织中, 在机体内外许多因素刺激下, 会导致这三种酶的表达, 从而产生大量的 NO, 并在维持细胞内环境中发挥重要作用。随着人们对 NO 生物学研究的深入, 其免疫调节作用及其机理的研究也越来越深入, NO 也被认为是一种免疫分子, 在机体的非特异性免疫中扮演重要角色。机体的免疫系统中, 许多细胞的活动与 NO 有关, 如 Th1/Th2、中性粒细胞和巨噬细胞等 (Kiechle FL, 1996)。研究认为, 当抗原、细菌或病毒等进入机体后, 诱导 NOS 酶的表达, 导致巨噬细胞内产生大量 NO, 从而在细菌的杀灭和病毒破坏中发挥作用 (Valerie B, 2001)。试验发现, 有脾脏培养液中加入脂多糖 LPS 后, 检测发现 NO 的含量有显著性升高作用, 因此在许多研究中用 LPS 作为 NO 的诱导剂使用 (Charles J, 1994)。由此可见, 研究外源性物质对机体内 NO 和 NOS 的影响, 对阐述药物或毒物的药理或毒理学作用, 评价药物对机体免疫机能影响具有重要意义。

1.2.8.2 细胞因子

细胞因子 (cytokine) 是机体免疫细胞或非免疫细胞合成或分泌的具有生物活性的小分子多肽或糖蛋白的总称。淋巴细胞产生的细胞因子称为淋巴因子; 单核细胞产生的细胞因子称为单核细胞因子; 纤维细胞或内皮细胞产生的可刺激骨髓干细胞或祖细胞分化成熟的细胞因子叫集落刺激因子 (colony stimulating factor, CSF)。细胞因子参与机体的多种生理活动的调节, 调节免疫, 参与细胞间的互相作用, 调节细胞的生长和分化等 (金伯泉, 2001)。研究细胞因子有助于阐明分子水平的免疫调节机制, 有助于疾病的预防、诊断和治疗, 特别是利用细胞因子治疗肿瘤、感染、造血功能障碍、自身免疫病等, 已收到初步疗效, 具有非常广阔的应用前景。目前, 已知的细胞因子有多种, 其在免疫调节过程发挥的作用也各不相同。肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF) 是一类能直接造成肿瘤细胞死亡或凋亡的细胞因子, 而对机体其它细胞几乎无毒性作用。根据其来源和结构分为两种, 即 TNF- α 和 TNF- β , 前者由单核巨噬细胞产生; 后者由活化的 T 细胞产生, 又名淋巴毒素(lymphotoxin)。TNF- α 是一种多功能细胞因子, 具有广泛的生物学特性, 其最显著的活性特征是在体内外特异性地杀伤肿瘤细胞, 而对正常细胞无明显毒性作用(Laird S.M, 2003; Keller C, 2003; Robert F, 2006)。白细胞介素 2 (interleukin-2, IL-2) 是由 CD⁴⁺T 细胞产生, CD⁸⁺T 细胞也可产生, 其生物学作用是活化 CD⁴⁺和 CD⁸⁺T 细胞, 促进其它细胞因子的产生, 还能够刺激 NK 细胞增殖、活化, 诱导 LAK 细胞的产生, 对 B 细胞活、增殖、抗体的产生有积极作用, 还能激活单核-巨噬细胞(Yun Jiang, 1999)。白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 主要由 Th2 细胞产生, 也可由单核-巨噬细胞、血管内皮细胞、成纤维细胞产生, 其生物学功能主要有刺激肝细胞合成急性期血浆蛋白, 参与炎症反应; 刺激活化 B 细胞的增殖, 分泌抗体; 协同刺激 T 细胞、胸腺细胞和骨髓造血干细胞增殖; 促进骨髓瘤细胞增殖等(Nicholas J. 1999; Eric Jüttler, 2002)。可见这三种细胞因子在机体的免疫调节中, 有重要作用。在外源性或内源物质、病原微生物入侵、病理或异常生理过程中, 细胞因子可能会产生诱导或抑制作用。喹胺醇是 quinoxaline-1,4-dioxide 结构衍生物, 是一种新型的抗菌促生长药物性添加剂。近年来对添加剂对免疫机能的影响研究较多, 但集中在多肽类、酶制剂和中药添加剂等方面, 对药物性添加剂尤其是喹啉类(如喹乙醇等)对机体免疫机能的影响研究相对较少, 还未见影响免疫细胞活性因子的研究报道。

1.3 研究内容与方法

1.3.1 研究内容

1.3.1.1 喹胺醇在靶动物体内药代动力学研究

猪单剂量口服喹胺醇药代动力学研究；猪单剂量静脉注射喹胺醇药代动力学研究；喹胺醇的排泄途径研究；鸡多剂量口服喹胺醇的药代动力学研究。

1.3.1.2、喹胺醇对细胞色素 P450 的影响

喹胺醇对肝微粒体细胞色素 P450 基因表达的影响；喹胺醇对肝微粒体蛋白和细胞色素 P450、b5 水平影响；喹胺醇对细胞色素 P450 同工酶活性的影响。

1.3.1.3、喹胺醇对机体抗氧化机能的影响

喹胺醇对抗氧化酶活性影响；喹啉类药物与氧应激关系研究；喹胺醇与机体自由基代谢间的关系研究。

1.3.1.4、喹胺醇对机体免疫机能的影响

喹胺醇对大鼠血液学变化的影响；喹胺醇对小鼠外周血细胞因子水平的影响；喹胺醇对腹腔巨噬细胞 NO 及其酶活性的影响。

1.3.2 研究方案

1.3.2.1、药代动力学研究

药代动力学以靶动物猪为试验对象，单次给药，给药途径分别为胃导管灌胃和耳缘静脉注射；以鸡为试验对象，多次口服喹胺醇。在药代动力学实验理论指导下，分别采集不同的生物样品，借助于 HPLC 技术，通过药物在生物样品中的浓度变化，阐述喹胺醇的药代动力学参数。

1.3.2.2、喹胺醇的排泄研究

以靶动物猪为试验动物，单次口服大剂量的喹胺醇，收集给药前后不同时间动物排出的尿液和粪便，用萃取法提取其中的喹胺醇，再利用 HPLC 技术检测其中原药的含量，以确定药物的排泄途径和排泄率。

1.3.2.3、肝药酶分析

给大鼠连续口服给药后，提取肝组织微粒体。用酶学对肝微粒体蛋白含量、细胞色素 P450、细胞色素 b5 的水平进行分析和研究；用紫外、荧光法分析细胞色素 P450 同工酶和 GST 活性；利用 RT-PCR 技术对 CYP450 亚型的基因表达进行分析和研究。

1.3.2.4、喹胺醇对自由基代谢影响研究

以猪为试验动物，分别单次口服高剂量和静脉注射小剂量的喹胺醇，通过检测抗氧化酶活性的变化和脂质过氧化产物 MDA 的含量变化，评估喹胺醇引起氧应激的潜在性作用；以小鼠为试验动物，连续口服不同剂量的喹胺醇 30d 再停药 10d。在给药的不同时间段分别检测了血液中抗氧化酶活性、脂质过氧化反应，检测肝组织自由基水平和抗自由基的能力，阐述了喹胺醇与自由基代谢间的关系。

1.3.2.5、喹胺醇免疫机能的影响研究

以小鼠为试验动物，连续口服喹胺醇后，分别在不同时间利用放射免疫法分析了外周血 TNF、IL-2 和 IL-6 的变化水平；将提取的腹腔巨噬细胞在体外进行原代培养，分别在不同时间在培养基中加入不同剂量的喹胺醇，分析喹胺醇对 NO 和 iNOS 的影响；以大鼠为试验动物，连续口服喹胺醇后，利用细胞自动分析技术，检测喹胺醇对血细胞变化的影响。

第二章 “喹胺醇”药代动力学研究

喹胺醇 (*Kuianchun*) 由中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所研制而成, 是一种新型兽用药物性饲料添加剂, 母体结构为对二氮杂萘-N,N'-二氧化物(Quinoxaline-1,4-dioxide) (梁剑平, 2001), 与近年来报道的卡巴氧、痢菌净、喹烯酮、喹赛多等一样, 有良好的促生长作用和抗菌效果, 对革兰氏阴性菌如大肠杆菌、沙门氏菌等有明显抑制作用 (Carta. A, 2005; 张力, 2001; 张丽芳, 2005)。喹胺醇作为一种新型兽用产品, 前期研究结果表明在畜产品中的残留量少、毒副作用小, 但促生长作用却较好, 因此有望成为喹乙醇等的替代品候选药。本实验通过口服和静脉注射两种给药途径, 利用 RP-HPLC 技术, 在试验动物猪和鸡体内研究了喹胺醇的代谢过程, 分析了药代动力学特征, 旨在为临床安全用药提供科学的理论依据。

2.1 喹胺醇结构鉴定

2.1.1 材料与方法

2.1.1.1 药物 喹胺醇由中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所新兽药研究室提供, 纯度为 98.7%, 本实验室再行纯结晶纯化后, 做供试药物。

2.1.1.2 试剂 乙腈、甲醇、氯仿、KBr 为色谱纯, 其余试剂均为国产分析纯。

2.1.1.3 仪器 Cintra-6 型紫外-可见分光光度计 (澳大利亚, GBC); Nicolet NEXUS 670 型 FT-IR 傅立叶红外光谱仪 (美国, THERMO); ZAB-HS 型质谱仪 (英国, MICROMASS); INOVA-400MHz 超导核磁共振波谱仪 (德国, BRUKER)。

2.1.1.4 紫外检测 将纯结晶所得喹胺醇用色谱乙腈配制成 2.20 μ g/mL 的溶液; 然后在 450nm-200nm 之间扫描, 检测喹胺醇的紫外吸收波长。

2.1.1.5 红外检测 采用 KBr 压片法。

2.1.1.6 NMR 检测 溶剂为 CDCl₃, 分别对氢谱和碳谱进行检测和分析。

2.1.1.7 质谱检测 用快速原子轰击法 (FAB-MS)

2.1.2 结果

2.1.2.1 紫外检测结果 由图 2-1 可见, 喹胺醇在紫外可见光谱下有三个吸收峰, 对应波长分别为 352.00nm、255.60nm、236.60nm, 对应的吸光度 0.2584、0.1729、0.2014。

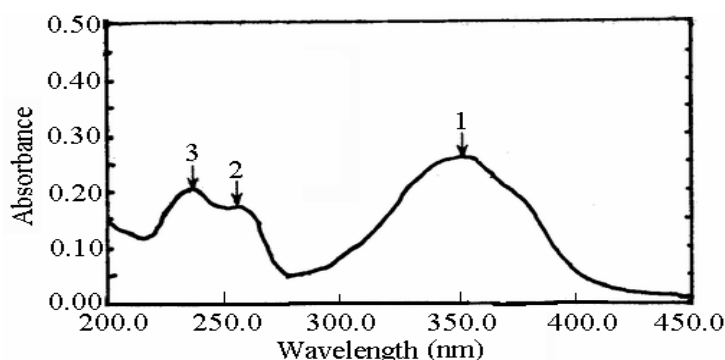


图 2-1 喹胺醇的紫外可见扫描曲线

Fig. 2-1 Scanning curve of *kuianchun* under UV spectrum

2.1.2.2 红外检测结果 红外检测结果为 (KBr) cm^{-1} : 3500~2846, 3103, 1668, 1604, 1546, 1316, 1335, 1271, 758 (见图 2-2), 均检测到喹胺醇的功能基团。

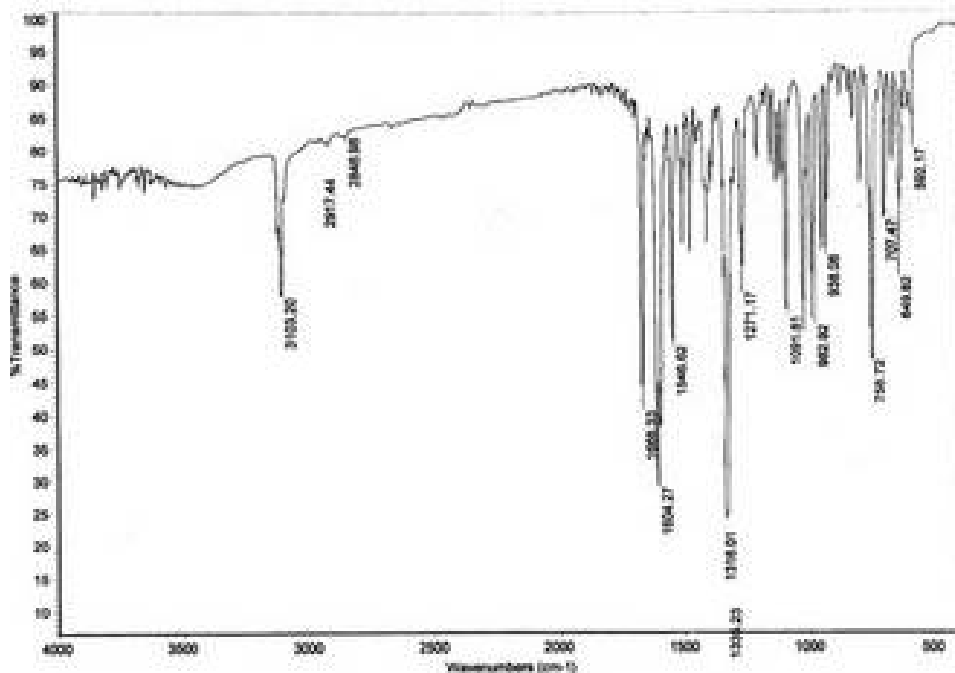


图 2-2 喹胺醇的红外扫描曲线

Fig. 2-2 Scanning curve of *kuianchun* under infrared spectrum

2.1.2.3 质谱检测结果 从质谱扫描图上可见, 在分子离子峰 296.8 处, 就是被检物喹胺醇。

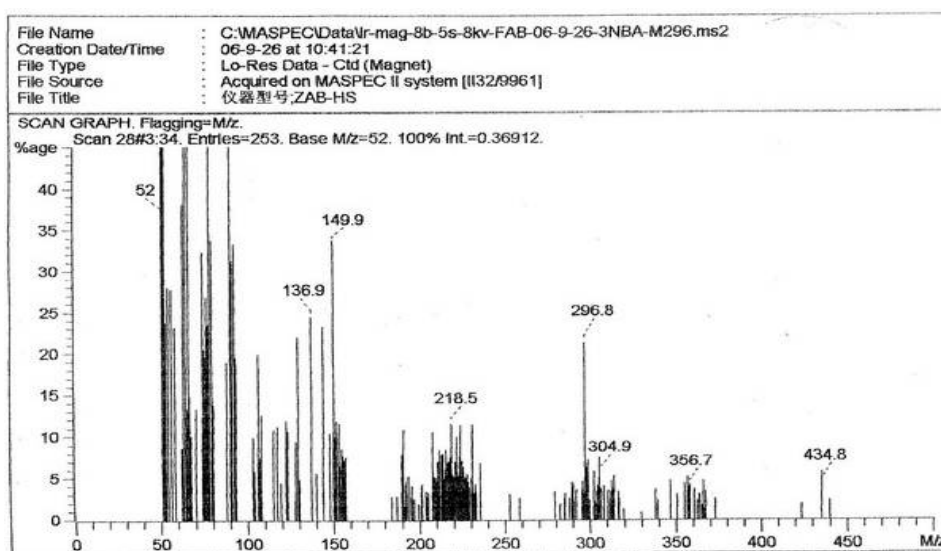


图 2-3 喹胺醇的质谱图

Fig. 2-3 Scanning curve of *kuianchun* under mass spectrumr

2.1.2.4 核磁检测结果 核磁碳氢谱检测结果 ^1H NMR (CDCl_3) δ ppm: 8.61(1H, d, $J=8.4\text{Hz}$, H-5), 8.55(1H, d, $J=8.4\text{Hz}$, H-8), 7.85(2H, m, H-6, H-7), 7.53(1H, H-16), 7.34(1H, d, $J=15.6\text{Hz}$, H-13), 6.96(1H, d, $J=15.6\text{Hz}$, H-12), 6.75(1H, d, $J=3.6\text{Hz}$, H-18), 6.49(1H, dd, $J=2.0, 3.6\text{Hz}$, H-17), 2.53(3H, s, 3- CH_3); ^{13}C NMR(CDCl_3) δ ppm: 185.2, 150.4, 146.4, 139.9, 139.1, 137.8, 136.9, 132.7, 132.5, 131.4,

121.9, 120.2, 120.1, 118.5, 113.2, 14.2。

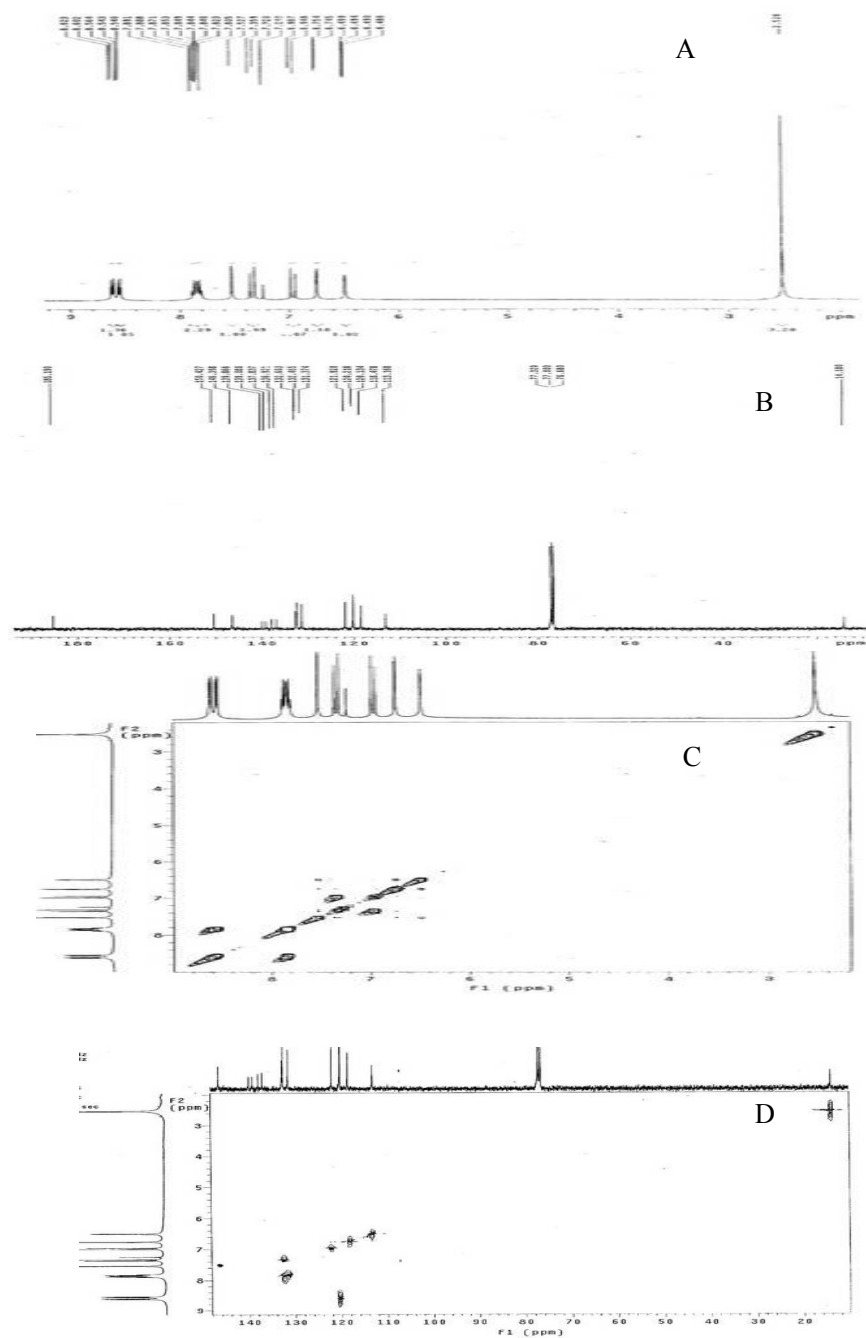


图 2-4 喹胺醇 NMR 图谱: A 为 ^1H NMR, B 为 ^{13}C NMR, C 为 COSY, D 为 HMQC

Fig. 2-4 NMR spectrum of *kuianchun*: A for ^1H NMR, B for ^{13}C NMR, C for COSY, D for HMQC

2.1.3 讨论

分析上述检测数据可知, 试验药物与喹胺醇设计结构一致, 母体结构和官能团均被检测到。因此, 可以进行后续实验。

2.2 喹胺醇在猪体内药代动力学研究

2.2.1 材料与方法

2.2.1.1 药品与试剂

喹胺醇由中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所新兽药研究室提供,纯度为98.7%,本实验室再行纯化,纯度达99.7%。乙酰甲喹(Maquinox),由中国兽药监察所提供;乙腈、甲醇为色谱纯,其余试剂均为国产分析纯。

2.2.1.2 主要仪器

Waters高效液相色谱仪(Waters); Beckman JP-6型大容量低温离心机(Beckman); 岛津LIBROR L-1600TP型万分之一精密天秤(Shimadzu), Mettler Tdedo AX205分析天平(Mettler)。

2.2.1.2 实验动物

健康长白×约克夏杂交二元仔猪6头,雄性阉割,体重 20 ± 3 kg,正常免疫,购自甘肃省原种猪场。试验饲料均为自配,以玉米、麸皮和豆粕为主,不添加任何其它药物。

2.2.1.3 给药途径与剂量

试验猪购来后,分笼饲养,用自配饲料饲喂10d后,再行正式试验。口服给药,方法是将药物装入小胶囊后,通过导管用水直接冲入胃中,剂量为300mg/kg 体重;静脉给药,方法是将配制好的喹胺醇溶液通过耳缘静脉注入体内,剂量为3.3mg/kg 体重。口服和静脉注射均为单剂量。给药前12h禁食不禁水。

2.2.1.4 样品采集

分别在口服给药前及给药后0h、0.25h、0.5h、1h、2h、4h、6h、8h、12h、16h、24h、36h、48h从前腔静脉采血5.0mL,肝素抗凝,2 800 rpm离心15min,分离血浆,-20℃冰箱保存待用。20d后,再经耳缘静脉注射喹胺醇溶液,分别在给药前及给药后0、5min、10min、15min、30min、45min、1h、2h、3h、4h、6h、8h、12h、16h、24h、36h、48h同样方式采血,血样处理同上。

2.2.1.5 测试条件

Waters高效液相色谱仪系列: Waters 510型泵,480型紫外检测器,U6K型进样阀,AST型数据处理仪;固定相为Kromasil C18色谱柱(256×4.6mm, 5 μ),天津市航程科技仪器有限公司提供;流动相为乙腈-水(40:60),流速1.0mL·min⁻¹,柱温30.0 \pm 0.5℃,检测波长352nm,内标为乙酰甲喹(Mequinox)。

2.2.1.6 血中药物提取

(1)准确取各时点血浆样品1.0 mL,精确加入内标乙酰甲喹(浓度60 μ g/mL)100 μ L,涡旋振荡5 min;(2)加100 μ L 0.1mol/L 的盐酸,涡旋振荡5 min;(3)加1.0mL饱和(NH₄)₂SO₄ 涡旋振荡10 min;(4)加提取液(乙腈:乙酸乙酯:异丙醇=60:40:4)4.0mL,涡旋振荡20 min;(5)4 000 rpm离心20 min,取上层有机相于棕色离心管中;(6)余液加4.0mL提取液,涡旋振荡20 min;(7)4 000 rpm离心20 min,取上层有机相于前棕色离心管中;(8)余液加2.0mL提取液,涡旋振荡20 min;(9)4 000 rpm离心20 min,取上层有机相于前棕色离心管中;(10)合并三次提取有机相,60℃水浴氮气缓慢吹干;(12)残渣-20℃保存待测;(13)整个过程避光操作;(14)测定前,将残渣用流动相500 μ L溶解,用0.22 μ m的针筒式过滤器过滤后,取20 μ L 进样做RP-HPLC检测。

2.2.1.7 数据处理

实验数据采用中国农业科学院原中兽医研究所编制的MCPKP药代动力学程序处理,求得各试

验样品的药代动力学参数。

2.2.2 结果

2.2.2.1 线性范围与检测灵敏度

采用内标法，分别建立低、高两个浓度范围，浓度为 0.022~0.220 $\mu\text{g/mL}$ 、0.11~1.10 $\mu\text{g/mL}$ 见表 2-1。分别在 14 个试管中，准确量取 1.0mL 空白血浆，按设计浓度分别加入喹胺醇标准品，涡旋振荡 20min 后；再按上述样品提取过程分别处理，RP-HPLC 测定。以喹胺醇标准品曲线下面积和内标曲线下面积比值与喹胺醇标准品浓度间进行线性回归，标准曲线见图 2-5 和图 2-6，线性方程分别如下：

$$Y=0.7972X+0.0011 \quad R^2=0.9952, n=8 \quad (0.022\sim 0.220\mu\text{g/mL})$$

$$Y=0.8565X-0.0228 \quad R^2=0.9977, n=8 \quad (0.11\sim 1.10\mu\text{g/mL})$$

最低检出浓度为 0.02 $\mu\text{g/mL}$ ，最低检测量为 0.01 μg 。

2.2.2.2 精密度和准确度

分别将喹胺醇质控样品配制成浓度为 0.11、0.44、1.10、1.54 $\mu\text{g/mL}$ 的标准血浆样品，各三个平行，精确加入内标，样品处理和检测依上法操作，分别进行日内、日间精密度和准确度的分析。准确度计算方法如公式 2-1；精密度计算方法如公式 2-2，由表 2-2 可见，日内精密度 RSD 为 2.27%，日内准确度为 2.99%；由表 2-3 可见，测得的日间精密度 RSD 为 3.55%，日间准确度为 6.17%。

$$\text{准确度}(\%) = \frac{\left| \frac{\text{测得浓度} - \text{理论浓度}}{\text{理论浓度}} \right|}{\text{标准偏差}} \times 100\% \quad \text{公式 2-1}$$

$$\text{精密度}(\%) = \frac{\text{标准偏差}}{\text{理论浓度}} \times 100\% \quad \text{公式 2-2}$$

2.2.2.3 回收率

分别将喹胺醇质控样品配制成浓度为 0.11、0.44、1.10、1.54 $\mu\text{g/mL}$ 的标准空白血浆样品，各三个平行，精确加入与样品提取时相当量和浓度的内标，依样品处理法和检测操作。样品回收率以测得标准血样的曲线下面积和测得流动相中相应浓度的曲线下面积比值的百分比来表示，见公式 2-3。如表 2-4 所示，测得四个浓度的方法回收率由低到高分别为 97.86 \pm 6.45%、73.85 \pm 8.35%、65.77 \pm 5.37%、60.41 \pm 3.24%，平均值为 74.48 \pm 4.58%。方法回收率用血样中喹胺醇标准品曲线下面积和内标曲线下面积的比值与流动相中喹胺醇标准品曲线下面积和内标曲线下面积的比值的比值的百分比表示，见公式 2-4。如表 2-5 所示，测得四个浓度的方法回收率由低到高分别为 119.21 \pm 6.76%、114.79 \pm 12.23%、102.47 \pm 7.70%、93.26 \pm 2.18%，平均值为 107.43 \pm 12.69%。

$$\text{样品回收率}(\%) = \frac{\text{标准血样 AUC}}{\text{标准流动相 AUC}} \times 100\% \quad \text{公式 2-3}$$

$$\text{方法回收率}(\%) = \frac{\text{AUC}_k/\text{AUC}_n}{\text{AUC}_{sm}/\text{AUC}_{sn}} \times 100\% \quad \text{公式 2-4}$$

表 2-1 标准曲线喹胺醇浓度
Table 2-1 *kuianchun* concentration of calibration

序号 Sequence	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
浓度 (μg/mL) Concentration (μg/mL)	0.022	0.044	0.066	0.077	0.088	0.099	0.110	0.220	0.330	0.440	0.550	0.660	0.880	1.100
AUC _k /AUC _i	0.0259	0.0507	0.0788	0.0946	0.1113	0.1204	0.1484	0.2700	0.3999	0.5478	0.6989	0.8102	1.065	1.2811

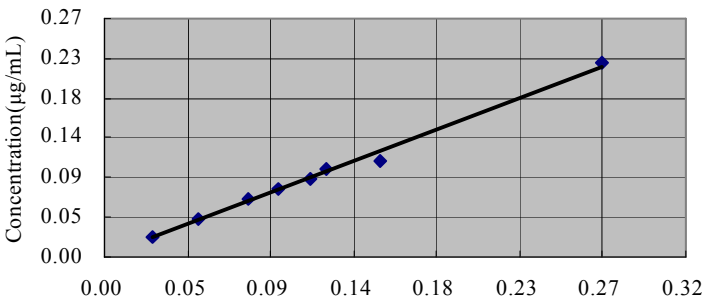


图 2-5 低浓度标准曲线

Fig. 2-5 The calibration curve of low concentration

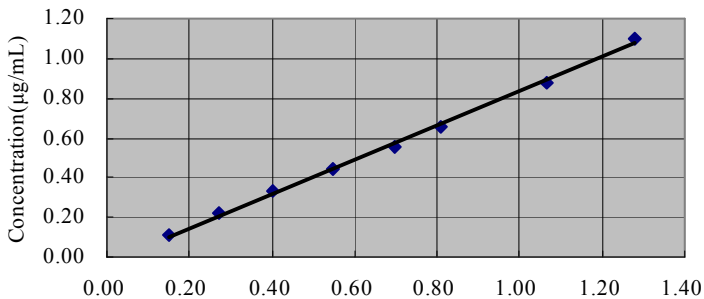


图 2-6 低浓度标准曲线

Fig. 2-6 The calibration curve of high concentration

表 2-2 日内精密度和准确度

Table 2-2 The relative standard deviation (RSD) and accuracy of intra-day

理论浓度 (μg/mL) Theoretical Concentration	测得浓度 (μg/mL) Calculated Concentration	SD	精密度 Precision RSD(%)	MEAN	准确度 Accuracy	MEAN
0.11	0.1091	0.0050	4.57		3.06	
0.44	0.4523	0.0091	2.01		2.79	
1.10	1.0675	0.0074	0.69	2.27±1.64	2.95	2.99±1.67
1.54	1.4908	0.0271	1.82		3.19	

表 2-3 日间精密度和准确度

Table 2-3 The relative standard deviation (RSD) and accuracy of inter-day

理论浓度 (μg/mL) Theoretical Concentration	测得浓度 (μg/mL) Calculated Concentration	SD	精密度 Precision RSD(%)	MEAN	准确度 Accuracy	MEAN
0.11	0.0987	0.0023	5.73		10.32	
0.44	0.4199	0.0105	2.49	3.55±1.48	4.58	6.18±2.89
1.10	1.0345	0.0331	3.20		5.96	
1.54	1.4807	0.0414	2.80		4.58	

表 2-4 样品回收率
Table 2-4 Sample Recovery

标准血样浓度(μg/mL) Standard concentration in blood(μg/mL)	回收率 (%) Recovery (%)	MEAN
0.1100	97.86±6.45	74.47±15.8
0.4400	73.85±8.35	
1.1000	65.77±5.37	
1.5400	60.41±3.24	

表 2-5 方法回收率
Table 2-5 Method Recovery

标准血样浓度(μg/mL) Standard concentration in blood(μg/mL)	回收率 (%) Recovery (%)	MEAN
0.1100	119.21±6.76	107.43 ±12.69
0.4400	114.79±12.23	
1.1000	102.47±7.70	
1.5400	93.26±2.18	

2.2.2.4 HPLC曲线行为

由图2-7可见，A为流动相中的喹胺醇和内标乙酰甲喹的HPLC色谱图，无杂质峰出现，喹胺醇的保留时间为8.0±1.0min，内标的保留时间为4±1.0min；由图B、C、D可见，在喹胺醇和内标乙酰甲喹保留时间附近亦无噪音峰。图2-8的A为口服给药后4h的血浆样品中内标和喹胺醇的HPLC色谱图，B为静脉注射给药后5min的血浆样品中内标和喹胺醇的HPLC色谱图，由图可见给药后采集的血浆样品喹胺醇附近HPLC色谱图也无杂质峰，但在其后约4min的时间，又出现了一个新的吸收峰。

2.2.2.5 血药浓度

由表2-6和2-8可见，无论是单剂量口服还是静脉注射喹胺醇，血浆中喹胺醇原药的浓度均不高；口服喹胺醇后6h时，血液中药物浓度最高，约为0.5109μg/mL；口服喹胺醇后血药浓度观察值和拟合值间的相关系数 $R^2=0.9171\pm0.0405$ 。而静脉注射喹胺醇后，5min时血液中药物浓度0.6118μg/mL，高于口服血药最高浓度；静脉注射喹胺醇后血药浓度观察值和拟合值间的相关系数 $R^2=0.9648\pm0.0204$ 。

表 2-6 口服喹胺醇后血药浓度观察值(μg/mL)

Table 2-6 The observed drug concentration in plasma after oral administration *kuianchun*(μg/mL)

Time(h)	动物号 Animal sequence					MEAN±SD
	k1	k2	K3	K4	K5	
0.25h	0.0476	0.078	0.1323	0.1532	0.0203	0.0863±0.0559
0.5h	0.097	0.1549	0.291	0.1611	0.057	0.1522±0.1091
1h	0.1008	0.2948	0.3649	0.3068	0.3671	0.2869±0.1371
2h	0.1504	0.394	0.4792	0.4926	0.3759	0.3784±0.1373
4h	0.1801	0.4375	0.5202	0.5279	0.3827	0.4097±0.1418
6h	0.2956	0.5189	0.5999	0.6066	0.5336	0.5109±0.1265
8h	0.2893	0.4294	0.5272	0.5393	0.4818	0.4534±0.1014
12h	0.2797	0.3522	0.4741	0.4512	0.3329	0.3780±0.0821
16h	0.1919	0.2057	0.2815	0.2894	0.2201	0.2377±0.0448
24h	0.129	0.1806	0.2309	0.2122	0.2146	0.1935±0.0404
48	0.0348	0.055	0.1267	0.1227	0.0157	0.0710±0.051

表 2-7 口服喹胺醇后血药浓度拟合值($\mu\text{g/mL}$)Table 2-7 The estimated drug concentration in plasma after oral administration *kuianchun*($\mu\text{g/mL}$)

Time(h)	动物号 Animal sequence					MEAN \pm SD
	k1	k2	K3	K4	K5	
0.25	0.0274	0.0831	0.1323	0.1048	0.0574	0.081 \pm 0.0407
0.5	0.0525	0.1542	0.291	0.193	0.1345	0.165 \pm 0.0871
1	0.096	0.2662	0.3798	0.329	0.2562	0.2654 \pm 0.1071
2	0.1615	0.4025	0.4672	0.4856	0.404	0.3842 \pm 0.1299
4	0.2327	0.487	0.5216	0.5637	0.4929	0.4596 \pm 0.1304
6	0.2573	0.4732	0.5128	0.531	0.4723	0.4493 \pm 0.1103
8	0.2581	0.433	0.4856	0.4759	0.4218	0.4149 \pm 0.0918
12	0.2305	0.3483	0.4229	0.3784	0.317	0.3394 \pm 0.0723
16	0.1932	0.2795	0.3656	0.3106	0.2339	0.2766 \pm 0.0668
24	0.1281	0.1834	0.2727	0.2297	0.1266	0.1881 \pm 0.0638
48	0.0348	0.055	0.1131	0.1232	0.02	0.0692 \pm 0.0465

表 2-8 静注喹胺醇后血药浓度观察值($\mu\text{g/mL}$)Table 2-8 The observed drug concentration in plasma after injection *kuianchun* in vein ($\mu\text{g/mL}$)

Time(min)	动物号 Animal sequence					MEAN \pm SD
	Z1	Z2	Z3	Z4	Z5	
5	0.5707	0.6795	0.4734	0.6152	0.7202	0.6118 \pm 0.0964
10	0.3827	0.5385	0.3547	0.458	0.5725	0.4613 \pm 0.0947
15	0.2975	0.1896	0.1992	0.2249	0.2381	0.2299 \pm 0.0425
30	0.1992	0.1447	0.1322	0.1751	0.1534	0.1549 \pm 0.0362
45	0.1283	0.1202	0.1106	0.0927	0.069	0.0865 \pm 0.0423
60	0.0579	0.0389	0.0294	0.0579	0.0602	0.0470 \pm 0.0174
120	0.0244	0.0181	0.0185	0.0194	0.0213	0.0203 \pm 0.0026
180	0.0125	0.0094	0.0135	0.0089	0.0139	0.0116 \pm 0.0023

表 2-9 静注喹胺醇后血药浓度拟合值($\mu\text{g/mL}$)Table 2-8 The estimated drug concentration in plasma after injection *kuianchun* in vein ($\mu\text{g/mL}$)

Time(min)	动物号 Animal sequence					MEAN \pm SD
	Z1	Z2	Z3	Z4	Z5	
5	0.5707	0.6484	0.5111	0.6152	0.6678	0.6026 \pm 0.063
10	0.3827	0.4579	0.3111	0.458	0.4635	0.4146 \pm 0.0669
15	0.2862	0.3275	0.2084	0.3506	0.3298	0.3005 \pm 0.0565
30	0.1745	0.1334	0.1048	0.1843	0.1434	0.1481 \pm 0.0321
45	0.1273	0.0678	0.0765	0.1162	0.084	0.0944 \pm 0.026
60	0.0953	0.0433	0.0604	0.0807	0.0602	0.068 \pm 0.0202
120	0.0303	0.0182	0.0248	0.0237	0.0264	0.0247 \pm 0.0044
180	0.0097	0.0094	0.0102	0.0072	0.0125	0.0089 \pm 0.0019

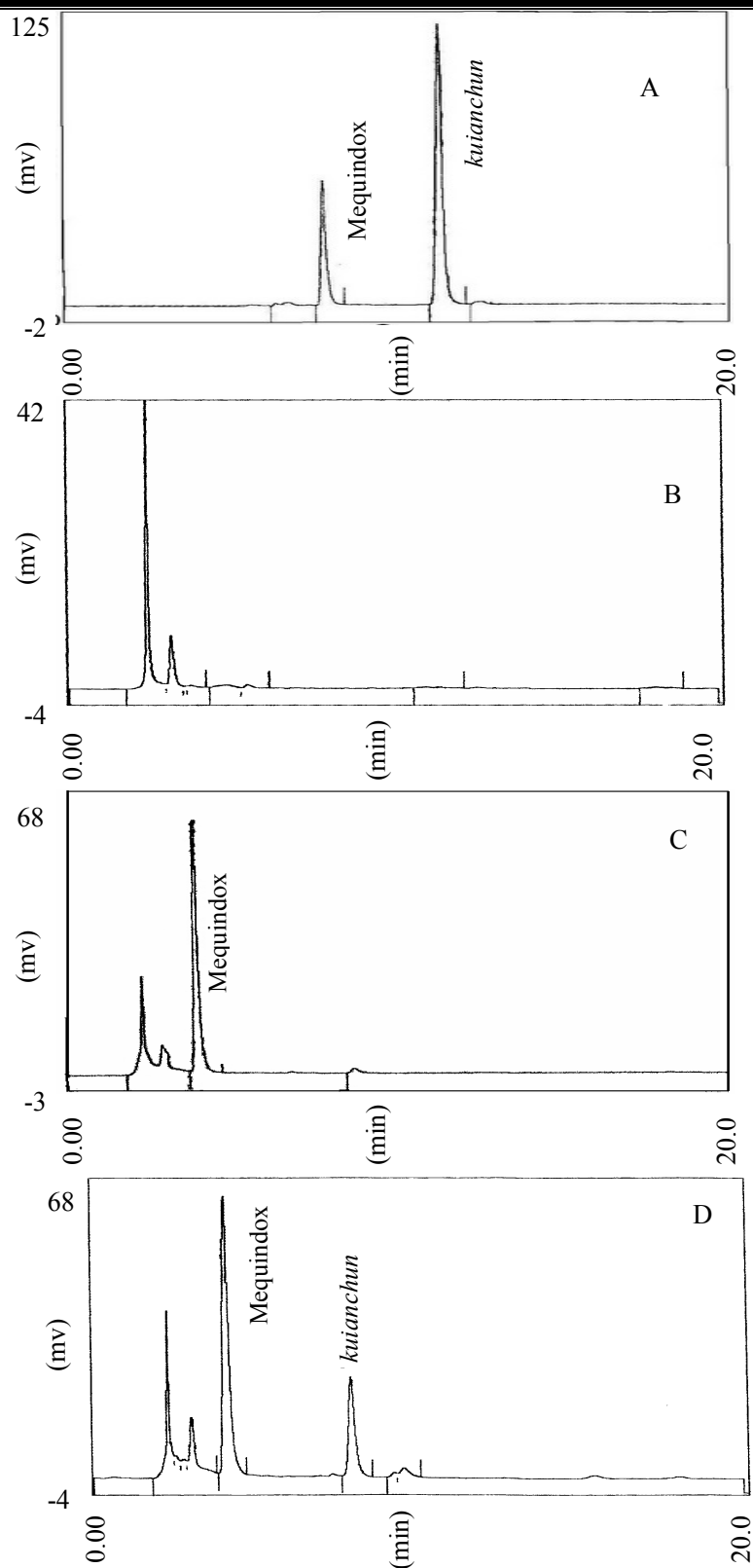


图 2-7 A 为流动相中喹胺醇和内标乙酰甲喹的 HPLC 曲线；B 为空白血浆的 HPLC 曲线；C 为空白血浆中内标乙酰甲喹的 HPLC 曲线；D 为空白血浆中喹胺醇和乙酰甲喹的 HPLC 曲线

Fig. 2-7 Chromatograms for (A) mobile phase with internal standard and *kuianchun* standard (B) blank plasma (C) blank plasma with internal standard (D) blank plasma with internal standard and *kuianchun* standard

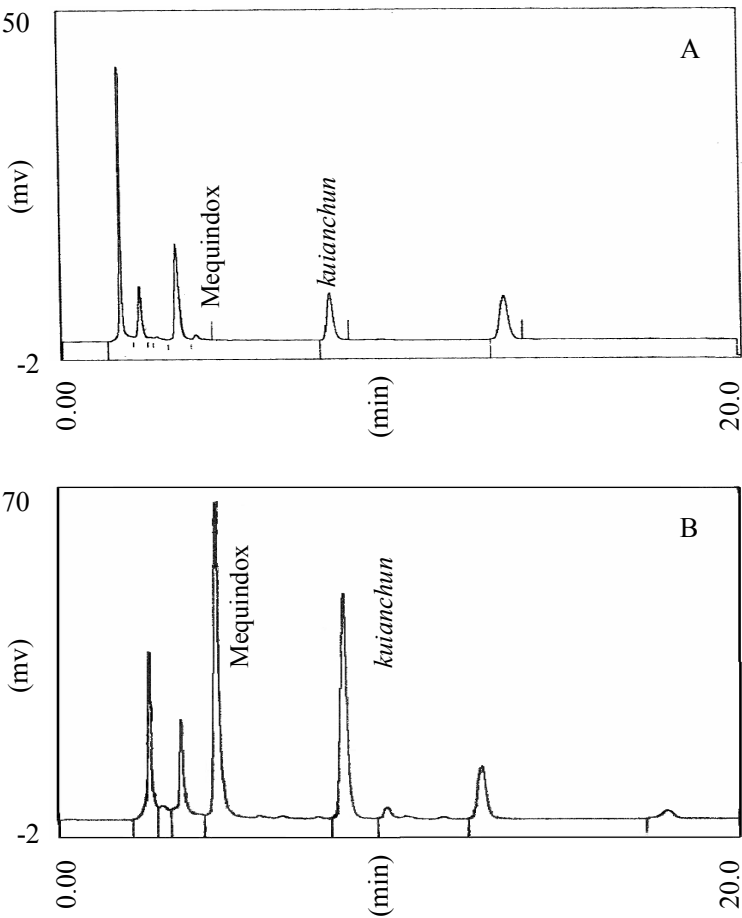


图 2-8 A 为口服喹胺醇后 4h 的血浆 HPLC 曲线 B 为静脉注射喹胺醇 5min 后的血浆 HPLC 曲线

Fig. 2-8 Chromatograms for (A) the plasma obtained from a pig at 4 h after oral administration of 100 mg/kg *kuianchun* (B) the plasma obtained from a pig at 5 minutes after venous injection of 3 mg/kg *kuianchun*

2. 2. 2. 6 药时曲线

图2-9所示，口服喹胺醇后，药时曲线的趋势，呈一室动力学模型曲线，48h虽可检测出喹胺醇的存在，但浓度及低；图2-10所示，静脉注射喹胺醇后，药时曲线的趋势，呈典型的二室动力学模型曲线，3h后即检测不出喹胺醇原药的存在。

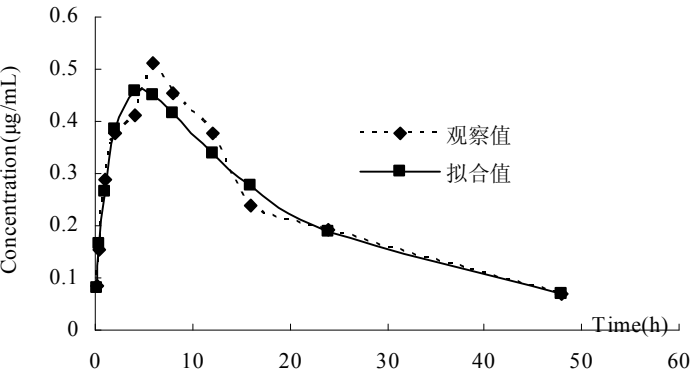


图 2-9 口服喹胺醇后药时曲线
Fig. 2.9 Fitting curve of concentration time profile of *kuianchun* in plasma after oral administration *kuianchun*

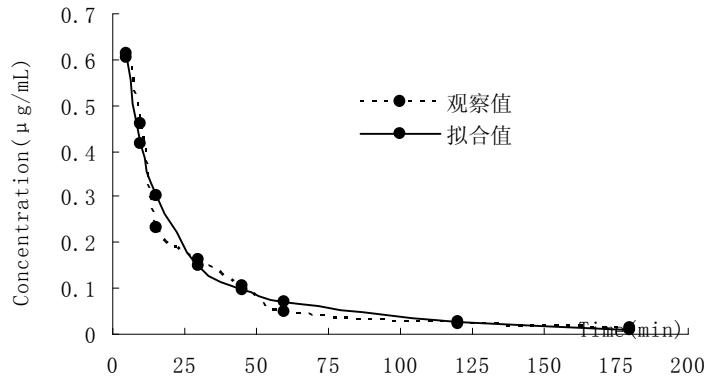


图 2-10 静脉注射喹胺醇后药时曲线
Fig. 2.10 Fitting curve of concentration time profile of kuianchun in plasma after injection
kuianchun

2. 2. 2. 7 药代动力学参数

猪单剂量口服喹胺醇后，药代动力学参数见表2-11；单剂量静脉注射喹胺后，药代动力学参数见表2-10。

表 2-10 静脉注射喹胺醇后动学参数
Table 2-10 Pharmacokinetics parameters after injection *kuianchun* in vein

药动学参数 Pharmacokinetics parameters	单位 Unit	动物号 Animal number					平均数 MEAN±AD
		Z1	Z2	Z3	Z4	Z5	
Dose	mg/kg	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3
Co	μg /mL	1.0033	0.9557	1.1626	0.8471	0.7140	0.9365±0.1684
A	μg /mL	0.8984	0.7583	1.0570	0.5098	0.5701	0.7587±0.2030
B	μg /mL	0.1049	0.1975	0.1057	0.3373	0.1439	0.1779±0.0866
α	/h	5.8545	6.6242	6.2405	8.1652	6.1054	6.5980±0.8222
β	/h	0.8626	1.1707	0.7218	1.4206	1.0991	1.0550±0.2437
T _{1/2α}	h	0.1184	0.1046	0.1111	0.0849	0.1135	0.1065±0.0117
T _{1/2β}	h	0.8034	0.5919	0.9601	0.4878	0.6305	0.6947±0.1869
K ₁₂	/h	1.6851	2.1219	2.0569	2.6546	1.9132	2.0863±0.3592
K ₂₁	/h	1.3846	2.2975	1.2233	4.1065	2.1081	2.2240±1.1477
K _{el}	/h	3.6474	3.3755	3.6820	2.8248	3.1831	3.3426±0.3545
V ₁	l/kg	3.2891	3.4529	2.8385	3.8956	4.6216	3.6195±0.6759
V _B	l/kg	13.9075	9.9557	14.4796	7.7459	13.3847	9.1132±5.7592
C _{LB}	l/kg/h	11.9970	11.6553	10.4512	11.0041	14.7112	11.9638±1.6472
AUC	mg/l·h	0.2751	0.2831	0.3158	0.2999	0.2243	0.2796±0.0379
FC		0.2365	0.3468	0.1960	0.5029	0.3453	0.3255±0.1194
TCP(ther)	h	8.0634	8.4484	12.834	7.3391	8.7111	9.0792±2.1617

表 2-11 猪单剂量口服喹胺醇后药代动力学参数
Table 2-11 Pharmacokinetics parameters after oral administration *kuianchun*

药动学参数 Pharmacokinetics parameters	单位 Unit	动 物 号 Animal number					平均数 MEAN±SD
		K1	K2	K3	K4	K5	
Dose	mg /kg	300.0	300.0	300.0	300.0	300.0	300.0
Co	μg /ml	0.4113	0.5999	0.6384	0.6828	0.7056	0.6098±0.1124
Ka	/h	0.2737	0.6263	0.9651	0.6601	0.4089	0.5708±0.2894
K	/h	0.0563	0.0570	0.0395	0.0458	0.0755	0.0557±0.0125
T1/2 Ka	h	2.5323	1.1065	0.7181	1.0498	1.6947	1.6297±1.1453
T1/2K	h	12.3072	12.1541	17.5254	15.1367	9.1824	13.0892±3.2674
Tp	h	7.2740	4.2096	3.4518	4.3438	5.2551	5.1994±2.0785
Cmax	μg /ml	0.2731	0.4719	0.5570	0.5596	0.4811	0.4639±0.1269
AUC	mg/l·h	7.3050	10.5220	16.1460	14.913	9.3494	11.5812±3.8488
Lagtime	h	0	0	0	0	0.1875	0.0375±0.0839
TCP(ther)	h	43.862	41.908	93.706	37.491	50.42	53.48±22.96

2. 2. 2. 8 喹胺醇的生物利用度

喹胺醇的生物利用度用绝对生物利用度来表示，见公式2-5，计算得喹胺醇的绝对生物利用度约为45.56%。

$$\text{绝对生物利用度} = \frac{D_{iv} \times AUC_{oral}}{D_{oral} \times AUC_{iv}} \times 100\%$$

公式 2-5

表2-12 喹胺醇的生物利用度
Table 2-12 Bioavailability of *kuianchun*

动物号 Number	口服剂量 Oral dose	静注剂量 Injection dose	口服曲线下面积 Oral AUC	静脉注射曲线下 面积 Injection AUC	生物利用度(%) Bioavailability(%)
1	276.78	3.3	6.9757	0.2751	30.23
2	300.648	3.3	10.522	0.2831	40.80
3	300.72	3.3	16.146	0.3158	56.11
4	299.18	3.3	14.913	0.2999	54.85
5	300.28	3.3	9.3494	0.2243	45.81
MEAN	295.52	3.3	11.5812	0.2796	45.56

2.2.3 讨论

2. 2. 3. 1 HPLC保留时间和吸收峰

喹胺醇溶解在本实验用流动相后，其紫外扫描结果显示分别在352nm、255nm、236nm处有三个吸收峰。喹胺醇溶液再经RP-HPLC检测结果显示，236nm处杂质峰较多，影响了被检药物的特征吸收峰，在352nm、255nm处均有特征吸收峰，且无其它杂质峰干扰，但相同浓度的样品在352nm处的吸收峰峰高和曲线下面积均大于255nm处。因此，本实验检测波长选用了352nm。为避免实验

误差, 实验中选用乙酰甲喹作为内标, HPLC检测结果显示它的紫外吸收峰附近也没有明显杂质峰干扰, 而且稳定性较强。喹胺醇的保留时间在 8.0 ± 1.0 min左右, 而内标乙酰甲喹的保留时间在 4.0 ± 1.0 min左右, 重复性较好。

在同类结构药物的高效液相检测中, 由于实验条件不同, 即使结构相似的同类药物HPLC检测时, 出峰波长和保留时间会略有差异, 因此试验前均应做紫外扫描分析。喹噁啉药物喹乙醇在鱼体内提取物的HPLC吸收峰在372nm处(艾晓辉, 2003); 孙永学(1998)报道, 用甲醇和水(12:88)作为流动相, 鸡饲喂喹乙醇后药代动力学的HPLC检测发现, 血药提取物在356nm处有特征吸收峰。李剑勇(2004)等报道, 用甲醇和水(70:30)作为流动相, 喹烯酮在鸡组织中提取物的HPLC特征吸收峰则在312nm处。曹香林(2005)报道, 用乙腈和水作流动相, 鸡组织提取物中HPLC的特征吸收峰在334nm处。邱银生(2003)等报道, 用乙腈和水(20:80)作为流动相, 喹赛多猪血浆提取物的HPLC吸收峰在305nm处。邱银生(2003)报道, 卡巴氧代谢物喹噁啉-2-羧酸亦在320nm处有特征的HPLC紫外吸收峰。上述几种物质和喹胺醇一样, 均属喹噁啉类不同侧链衍生化合物。Anadon A(1990)等对喹乙醇在鸡体内的药代动力学和残留研究结果表明, 喹乙醇亦在相近的波长处有特征的HPLC吸收峰。痢菌净是另一种与喹胺醇相似结构的喹噁啉类药物, 其HPLC的特征吸收峰在365nm。由此可见, 以喹啉为母体结构的不同侧链的喹噁啉衍生化合物的HPLC特征吸收峰对应的波长可能多在300-380nm之间。

2.2.3.2 单剂量给药后药代动力学模型

药物代谢动力学是揭示药物在体内的动态变化规律, 即药物或代谢产物在各种体液、组织和排泄物中的水平随时间变化的过程(王广基, 2005)。它是借助数学方法, 根据体内药量和时间的关系, 建立相应的数学模型, 求得相应的参数, 从而描述药物体内过程的动态变化规律。本实验中, 给猪分别单次口服高剂量(300mg/kg 体重)和单次静脉注射低剂量(3mg/kg 体重)的喹胺醇后, 通过国产药代动力学软件MCPKP分析了喹胺醇在猪体内的药代动力学模型。结果显示, 单剂量口服喹胺醇后药代动力学符合一级一室开放模型, 而单剂量静脉注射给药后其药代动力学模型符合二室开放模型(陈章锐, 1987)。药代动力学房室模型对应的函数表达式分别见公式2-6和公式2-7所示。这与同类结构药物喹烯酮在猪体内的药代动力学研究结果相似(李剑勇, 2001)。但与鸡多次口服同类结构药物喹乙醇后, 体内药代动力学数学模型一级二室开放模型(孙永学, 1998)不同。

$$C = C_0 e^{-0.0557t} \quad \text{公式 2-6}$$

$$C = 0.7587e^{-6.5980t} + 0.1779e^{-1.5550t} \quad \text{公式 2-7}$$

2.2.3.3 单剂量口服喹胺醇后药代动力学参数

本实验结果显示, 单剂量口服 300mg/kg 体重的喹胺醇后, 其吸收半衰期 $T_{1/2ka}$ 为 1.6297 h, 消除半衰期 $T_{1/2k}$ 为 13.0892 h, 达峰时间 T_p 为 5.1994 h, 最高浓度 C_{max} 为 0.4639 $\mu\text{g/mL}$, 曲线下面积 AUC 也只有 11.5812 $\text{mg/L}\cdot\text{h}$ 。这表明该剂量下, 猪对喹胺醇的吸收和分布较快, 但消除则较慢。这可能与实验 48h 血液中还能检测到微量喹胺醇有一定关系。一般认为, 消除半衰期在 8-24h 之间则为慢消除类药物, 磺胺类药物就属于此类; 小于 1h 的药物属超快速消除; 1-4h 之间为快速消除; 4-8h 之间属中速消除。同类药物喹烯酮, 猪口服 30mg/kg 体重的剂量时(李剑勇, 2003), 其达峰时间和吸收半衰期均较大剂量口服喹胺醇的短。喹乙醇与喹胺醇相比分子量较小, 鸡多次口服 120mg/kg 体重的喹乙醇后, 吸收半衰期 $T_{1/2ka}$ 为 0.63 h, 分布半衰期 $T_{1/2\alpha}$ 为 1.12 h, 平均达峰时

间(T_{\max}) 为 1.19 h (孙永学, 1998)。这说明喹乙醇、喹烯酮的吸收、分布均比喹胺醇快。但是, 本试验中的给药剂量却比二者高数倍, 这可能是其达峰时间长和消除速率慢的主要原因。从血药最高浓度来看, 喹胺醇和同类结构药物喹烯酮一样均较低, 这可能与药物的生物利用度低有关。喹胺醇在组织内的分布量也很低, V_L 仅占 V_B 的 39.7%。前期研究结果表明, 鸡连续口服 50mg/kg 体重的喹胺醇 7d 后, 组织内的残留量很少, 最后一次给药 24h 后已用 RP-HPLC 技术检测不到原药的存在(张力, 2000; 曹香林, 2005), 这与本研究中血液药物浓度低可能有一定的相关性。由此推测, 靶动物口服正常剂量的喹胺醇后, 其吸收和分布可能较快; 药物的吸收率和生物利用度均可能较低, 正常给药剂量下不会导致药物在组织内的大量残留。

2.2.3.4 单剂量静脉注射喹胺醇后药代动力学参数

喹胺醇分子量较喹乙醇、乙酰甲喹大, 且几乎不溶于水, 属亲脂性较高的化合物, 很难找到合适的溶媒将其配制成能够在体内使用的注射液, 这给静脉注射研究药代动力学造成很大困难。本试验中, 用水和乙醇为溶剂, 甘油助溶, 将喹胺醇配制成浓度较低的溶液, 进行了静脉推注给药后的代谢动力学试验。结果显示, 静脉推注给药后, 分布半衰期 $T_{1/2\alpha}$ 仅为 6.39min, 消除半衰期 $T_{1/2\beta}$ 为 0.6947h, 说明静脉注射喹胺醇后, 其分布较快, 消除时间相对于口服给药却很短。中央室分布容积(V_L)占总体分布容积(V_B)的比例较小, 说明药物可能在机体内的分布较广, 这还有待进一步研究证实。结果提示, 喹胺醇在猪体内的消除可能较其它同类产品慢。

2.2.3.5 喹胺醇的生物利用度

上文看到, 由于缺乏溶媒, 所以分析喹胺醇的生物利用度相对较难。药物生物利用度的高低, 是反应机体吸收和利用药物的程度, 一般可用相对生物利用度和绝对生物利用度来表示(王广基, 2005)。本试验中二种给药途径所用药物剂量相差较大, 所以只能采用绝对生物利用度的算法, 在假定两种给药途径下消除率相同时, 对喹胺醇在猪体内的利用情况进行了推测和评估。结果显示, 口服喹胺醇后其绝对生物利用为 45.56%。据文献报道, 生物利用度在 80%以上, 可视为吸收较好, 在 60%以下则视为吸收较差。上述结果提示, 口服喹胺醇生物利用度低、血药浓度低等可能与吸收较差有关。

2.2.3.6 实验方法

本实验中, 为了减少实验过程中人为因素和其它不稳定因素所引起的误差对结果的影响, 选用了内标法进行检测。分别利用批内和批间精密度、准确度对试验方法进行了评估, 结果批内精密密度为 $2.27 \pm 1.64\%$ 、准确度为 $2.99 \pm 1.67\%$, 批间精密密度为 $3.55 \pm 1.48\%$ 、准确度为 $6.17 \pm 3.41\%$, 批内 RSD 小于 6, 批间 RSD 小于 8。回收率分别用样品回收率和方法回收率进行了评估, 结果显示二者分别为 $74.47 \pm 15.8\%$ 和 $107.43 \pm 12.69\%$ 。在标准曲线的制作中, 由于血药浓度较低, 因此采用高、低两个浓度范围, 低浓度标准曲线的 $R^2=0.9952$, 高浓度的标准曲线 $R^2=0.9977$ 。由上述指标可见, 样品的提取率虽然较低, 可能会影响样品的准确性, 但 RP-HPLC 检测方法较为稳定。

综上所述, 无论是静脉小剂量注射、还是大剂量口服喹胺醇后, 其吸收均较快、分布均较快, 但高剂量口服后的消除较慢, 血药浓度均相对较低, 生物利用度亦很低、吸收较差; 这与同类结构药物喹烯酮相似, 但和喹乙醇相差较大, 推测这可能是药物毒性低的原因之一; 猪单次口服 300mg/kg 体重的喹胺醇后, 药代动力学符合一室开放数学模型, 而静脉注射低剂量的喹胺醇后, 药代动力学符合二室开放数学模型; 在波长 352nm 处, HPLC 检测时紫外吸收峰曲线下面积较大、峰高也较好, 且该实验检测方法较为稳定, 建议可用于该药的临床安全性检测和质量制定的参考方法之一。

2.3 喹胺醇在猪体内排泄

2.3.1 材料与方法

2.3.1.1 药品与试剂

喹胺醇由中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所新兽药研究室提供,纯度为98.7%,本实验室再行纯结晶后纯度为99.7%。乙酰甲喹,由中国兽药监察所提供。乙腈、甲醇为色谱纯,其余试剂均为国产分析纯。

2.3.1.2 主要仪器

Waters高效液相色谱仪(Waters); Beckman JP-6型大容量低温离心机(Beckman); 岛津LIBROR L-1600TP型万分之一天秤(Shimadzu), Mettler Tdedo AX205分析天平(Mettler), 过滤柱(天津)。

2.3.1.2 实验动物

健康长白×约克夏杂交二元仔猪6头,雄性阉割,体重 20 ± 3.0 kg,正常免疫,购自甘肃省原种猪场。试验饲料均为自配,以玉米、麸皮和豆粕为主,不添加任何其它药物。

2.3.1.3 给药途径与剂量

试验猪购来后,分笼饲养,用自配饲料饲喂10d后,再行正式试验。口服给药,将药物装入小胶囊后,通过导管用水直接冲入胃中,剂量为300mg/kg 体重;静脉给药,将配制好的喹胺醇溶液通过耳缘静脉注入体内,剂量为3.0mg/kg 体重。口服和静脉注射均为单剂量。给药前12h禁食不禁水。

2.3.1.4 样品采集

分别在口服给药前及给药后0, 0~4, 4~8, 8~12, 12~16, 16~24, 24~48, 48~72、72~96、96~120h,收集每个动物的尿,并记录尿量,装入瓶中, -80℃冰箱保存待用;并在0, 0~12, 12~24, 24~36, 36~48, 48~72, 72~96 h, 收集每个动物的全部粪便,称重并记录, -80℃冰箱保存待用。

2.3.1.5 测试条件

Waters高效液相色谱仪系列: Waters 510型泵, 480型紫外检测器, U6K型进样阀, AST型数据处理仪; 固定相为Kromasil C18色谱柱(256×4.6mm, 5 μ), 天津市航程科技仪器有限公司提供; 流动相为乙腈-水(40:60), 流速1.0mL·min⁻¹, 柱温30.0±0.5℃, 检测波长352nm, 内标为乙酰甲喹。

2.3.1.6 尿中药物提取

(1) 准确量取各时点尿样品2.0 mL, 精确加入内标乙酰甲喹(浓度60 μ g/mL)100 μ L, 涡旋振荡5 min; (2) 加400 μ L 0.1mol/L 的盐酸, 涡旋振荡5 min; (3) 加1.0 mL饱和(NH₄)₂SO₄ 涡旋振荡10 min; (4) 加提取液(乙腈: 乙酸乙酯: 异丙醇=60: 40: 4) 8.0 mL, 涡旋振荡20 min; (5) 4 000 rpm离心20 min, 取上层有机相于棕色离心管中; (6) 余液加8.0 mL提取液, 涡旋振荡20 min; (7) 4 000 rpm离心20 min, 取上层有机相于前棕色离心管中; (8) 余液再加8.0 mL提取液, 涡旋振荡

20 min; (9) 4 000 rpm离心20 min, 取上层有机相于前棕色离心管中; (10) 合并三次提取有机相; (11) 用针筒式水型萃取柱缓慢过滤后, 60℃水浴中氮气缓慢吹干; (12) 残渣-20℃保存待测; (13) 整个过程避光操作; (14) 测试前, 将残渣用流动相500μL溶解, 用0.22μm的针筒式过滤器过滤后, 取20μl 进样, 做RP-HPLC检测。

2.3.1.7 粪样中药物提取

(1) 准确称取粪样3.0 g, 加3.0mL 0.9%的NaCl溶液, 匀浆5 min。(2) 精确加入内标乙酰甲喹(浓度60μg/mL)250μL, 涡旋振荡5 min; (3) 加600μL 0.1mol/L 的盐酸, 涡旋振荡5 min; (4) 加6.0 mL饱和(NH₄)₂SO₄ 涡旋振荡10 min; (5) 加提取液(乙腈: 乙酸乙酯: 异丙醇=60: 40: 4) 12.0 mL, 涡旋振荡20 mins; (6) 4 000 rpm离心25 min, 取上层有机相于棕色离心管中; (7) 余液加12.0 mL提取液, 涡旋振荡20 min; (8) 4 000 rpm离心25 min, 取上层有机相于前棕色离心管中; (9) 余液加12.0 mL提取液, 涡旋振荡20 min; (10) 4 000 rpm离心25 min, 取上层有机相于前棕色离心管中; (11) 合并三次提取有机相; (12) 用针筒式水型萃取柱缓慢过滤后, 60℃水浴中氮气缓慢吹干; (13) 残渣-20℃保存待测; (14) 整个过程避光操作; (15) 测定前, 将残渣用流动相500μL溶解, 用0.22μm的针筒式过滤器过滤后, 取20μl 进样, 做RP-HPLC检测。

2.3.1.8 数据处理

用SPSS 11.0软件计算各相应数据均数MEAN±SD间的差异显著性。

2.3.2 结果

2.3.2.1 尿样中喹胺醇的排泄

2.3.2.1.1 尿样线性范围与检测灵敏度

仍采用内标法, 分别建立低、高两个浓度范围, 浓度分别为 0.2784~1.9720μg/2mL、3.0160~23.9830μg/2mL, 见表 2-13。分别在 16 个试管中, 准确量取 2.0mL 空白尿, 按设计浓度分别加入喹胺醇标准品, 涡旋振荡 20 mins 后。再按上述样品提取过程分别处理, 做 RP-HPLC 测定。以喹胺醇标准品曲线下面积和内标曲线下面积比值与喹胺醇标准品浓度间进行线性回归(图 2-11 和 2-12), 线性方程分别如下:

$$Y=12.7785X-0.0634, R^2=0.9706, n=8, (0.2784\sim1.9720\mu\text{g}/2\text{mL});$$

$$Y=5.4259X+2.7031, R^2=0.9936, n=8, (3.0160\sim23.9830\mu\text{g}/2\text{mL})$$

最低检出浓度为 0.2784μg/mL, 最低检测量为 10ng。

2.3.2.1.2 尿精密度和准确度

分别将喹胺醇质控样品配制浓度为0.3712、0.696、3.016、12.992μg/2mL的标准空白尿样, 每个浓度各三个平行, 精确加入内标, 再按尿样品处理法依次处理和检测。分别进行日内和日间精密度和准确度的分析。准确度计算方法见公式2-1, 是用测得浓度与理论浓度差值的绝对值与理论浓度的比值百分比表示; 精密度计算方法如公式2-2, 用测得值的标准偏差与理论浓度比值的百分比表示。由表2-16可见, 日内精密度RSD为4.36%, 日内准确度为12.61%; 由表2-17可见, 日间精密度RSD为7.49%, 日间准确度为16.75%。

表 2-13 尿标准曲线浓度

Table 2-13 The concentration of calibration in urine

序号 Sequence	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
浓度 (µg/mL) Concentration (µg/mL)	0.2784	0.3712	0.4988	0.6032	0.696	0.8004	0.9976	1.972	3.016	4.002	5.974	8.004	12.992	15.979	19.981	23.983
AUC _k /AUC _i	0.016	0.0338	0.0443	0.0522	0.0636	0.0749	0.0918	0.1494	0.1848	0.2362	0.5016	1.0373	1.8868	2.3948	3.0027	4.0819

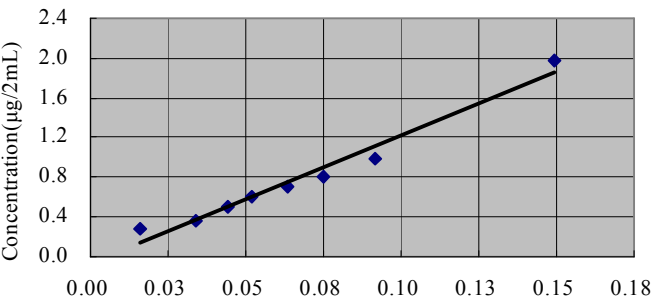


图 2-11 尿低浓度标准曲线

Fig. 2-11 Calibration curves of low concentration in urine

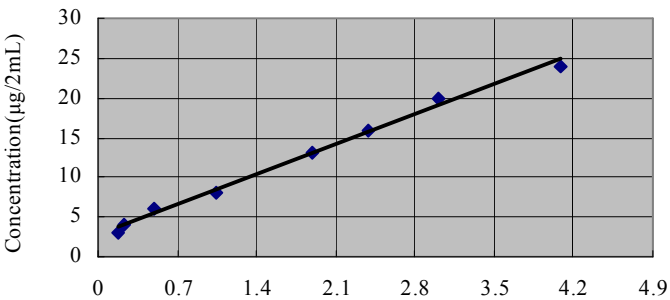


图 2-12 尿高浓度标准曲线

Fig. 2-12 Calibration curves of high concentration in urine

表 2-14 尿样品回收率

Table 2-14 recovery of urine sample

标准尿样浓度(µg/mL) Standard concentration in urine(µg/mL)	回收率 (%) Recovery (%)	MEAN±SD
0.6032	20.42±3.34	17.61±2.94
1.9720	19.68±4.54	
3.0160	16.12±3.02	
5.9740	14.21±3.46	

表 2-15 尿方法回收率

Table 2-15 Method Recovery of urine

标准尿样浓度(µg/mL) Standard concentration in urine(µg/mL)	回收率 (%) Recovery (%)	MEAN±SD
0.6032	28.13±1.23	20.72 ±3.42
1.9720	24.19±10.00	
3.0160	15.53±0.41	
5.9740	15.04±2.04	

表 2-16 尿日内精密度和准确度

Table 2-14 The relative standard deviation (RSD) and accuracy of intra-day in urine

理论浓度(μg/mL) Theoretical concentration	测得浓度(μg/mL) Calculated concentration	SD	精密度 Precision RSD(%)	MEAN	准确度 Accuracy	MEAN
0.3712	0.4216	0.015	3.56		13.57	
0.696	0.7736	0.0831	10.74	4.36	12.74	12.61
3.016	3.6855	0.0478	1.30		22.20	
12.992	12.7703	0.2364	1.85		1.93	

表 2-17 尿日间精密度和准确度

Table 2-15 The relative standard deviation (RSD) and accuracy of inter-day in urine

理论浓度(μg/mL) Theoretical concentration	测得浓度(μg/mL) Calculated concentration	SD	精密度 Precision RSD(%)	MEAN	准确度 Accuracy	MEAN
0.3712	0.3487	0.0576	16.5		12.51	
0.696	0.8230	0.0421	5.12	7.49	18.25	16.75
3.016	3.9440	0.0561	1.42		30.77	
12.992	12.2818	0.8510	6.93		5.46	

2.3.2.1.3 尿回收率测定

分别将喹胺醇质控样品配制成浓度为 0.6032、1.972、3.16、5.974μg/mL 的标准空白尿样品，各浓度三个平行，精确加入与样品提取时相当量和浓度的内标，依样品处理法和检测操作；再将喹胺醇质控样品配制成上述浓度的流动相溶液，各浓度三个平行，加入相应内标，上机检测。样品回收率以测得原药的标准尿样中的曲线下面积和测得流动相中相应浓度的样品曲线下面积比值的百分比来表示，见公式 2-3。如表 2-14 所示，测得四个浓度的样品回收率由低到高分别为 20.42±3.34%、19.685±4.54%、16.12±3.02%、16.12±3.02%，平均值为 17.61±2.94%。方法回收率用尿样品中喹胺醇标准品曲线下面积和内标曲线下面积的比值与流动相中喹胺醇标准品曲线下面积和内标曲线下面积的比值的百分比表示，见公式 2-4。如表 2-15 所示，测得四个浓度的方法回收率由低到高分别为 28.13±1.23%、24.19±4.23%、15.53±0.41%、15.04±2.18%，平均值为 20.72 ±3.42 %。

2.3.2.1.4 HPLC线性行为

由图2-13可见，A为空白尿样品中加入内标后的HPLC色谱图，B为空白尿中加入了内标和喹胺醇的标准样品的HPLC色谱图，C为口服给药后一头猪的尿样品中喹胺醇的HPLC色谱图。内标的保留时间为4.45±0.50 min，喹胺醇的保留时间为8.13±0.50 min。由图中可以看出，在内标和喹胺醇处，杂质峰的干扰较少。C图可见，喹胺醇吸收峰之后又有一个小的吸收峰出现，可能为喹胺醇的同分异构体，也可能为代谢物。

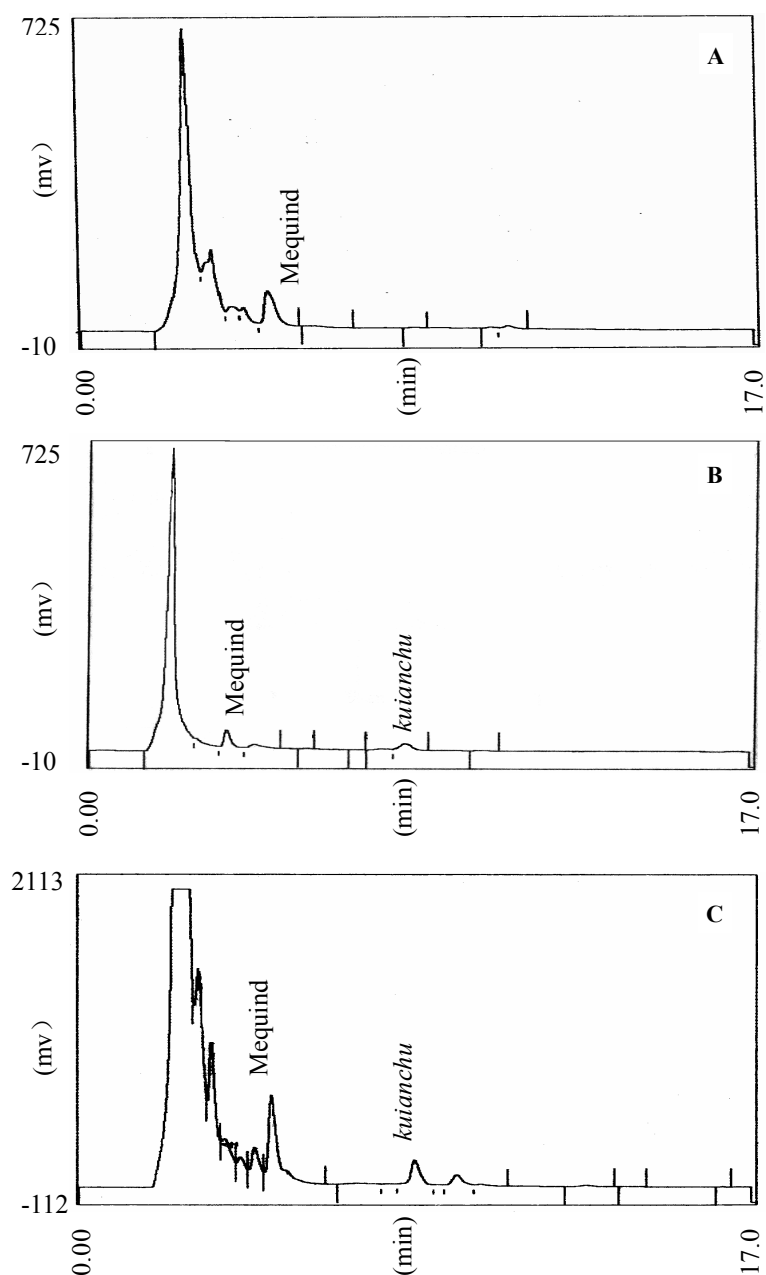


图 2-13 A 为空白尿加内标的 HPLC 色谱图, B 为空白尿加内标和喹胺醇的 HPLC 色谱图, C 为口服给药后一头猪的 HPLC 色谱图。

Fig. 2-13 Chromatograms for (A) blank urine with internal standard (B) blank urine with internal standard and *kuianchu* (C) urine obtained from a pig at 4 h after oral administration *kuianchu*

2.3.2.1.5 尿样品中药物浓度

由表2-18可以看出,尿液中药物的含量同样很低,但48-72h的尿液中可检测出喹胺醇原药的存在,说明一部分药以原型结构从尿中排出;由表2-19可以看出,从尿液中排出药物的总量很少,只占口服药物总量的0.31%。而静脉注射给药后,在试验动物的尿液中没有检测到喹胺醇原药的存在。如图2-14所示,尿药浓度随时间变化与血药浓度相似。

表 2-18 口服给药后各检测点尿中喹胺醇浓度 (μg/2ml)

Table 2-18 The *kuianchun* concentration in urine after oral administration at every examined time

时间 (h) Time(h)	动物号 animal number					MEAN±SD
	1	2	3	4	5	
0~5	4.3949	3.2475	4.3017	0.5116	4.5314	3.3974±1.69
5~8	7.8224	4.3927	8.0148	19.3402	5.8166	9.0773±5.93
8~12	9.4432	8.2895	16.4913	10.7855	5.4690	10.0957±4.08
12~24	8.4003	7.9231	8.5762	5.6893	8.8613	7.8900±1.28
24~36	6.3498	8.6721	9.1900	9.2717	7.5757	8.2119±1.24
36~48	4.4459	4.2219	4.8365	5.0694	3.4913	4.4130±0.61
48~72	0.1500	1.5647	0.7059	3.5875	3.8672	1.9751±1.68
72~96	—	—	—	—	—	—
96~120	—	—	—	—	—	—

注：“—”表示未检测到原药喹胺醇

表 2-19 尿中喹胺醇的回收率

Table 2-19 Recovery ratio of *kuianchun* from urine after oral administration

序号 (No)	体重 (KG)	回收总量 (mg)	总药量 (mg)	回收率 (%)
1	21.0	18.22	5812.300	0.31
2	19.0	18.47	5712.200	0.32
3	22.0	23.97	6615.800	0.36
4	20.0	22.49	5983.500	0.38
5	20.0	10.74	6005.600	0.18
MEAN				0.31

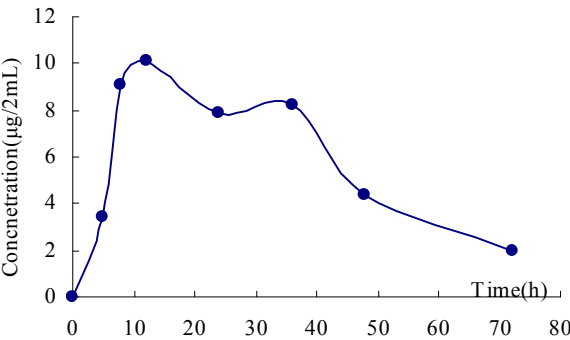


图 2-14 尿样中喹胺醇原药浓度随时间变化曲线

Fig. 2-14 Fitting curve of concentration time profile of *kuianchun* in urine after oral administration *kuianchun*

2.3.2.2 喹胺醇随粪排泄

2.3.2.2.1 粪样线性范围与检测灵敏度

采用内标法，建立低、中、高三个浓度范围，分别为 0.2784~1.9720μg/3g、9.5325~99.9750μg/3g、149.9625~755.0μg/3g（见表 2-19）。分别在 24 个试管中，准确称取 3g 空白粪样，按设计浓度分别加入喹胺醇标准品，涡旋振荡 20 min 后。再按上述样品提取过程分别处理，做 RP-HPLC 测定。以喹胺醇标准品曲线下面积和内标曲线下面积比值与喹胺醇标准品浓度间进行线性回归（图

2-11) , 线性方程分别如下:

$Y=10.1490X+0.0817 \quad R^2=0.9983 \quad \text{浓度范围: } 0.1008\sim9.9975\mu\text{g}/3\text{g} \quad n=9;$

$Y=11.891X-2.345 \quad R^2=0.9956 \quad \text{浓度范围: } 9.5325\sim99.9750\mu\text{g}/3\text{g} \quad n=9$

$Y=7.9236X+77.1990 \quad R^2=0.9898 \quad \text{浓度范围: } 149.9625\sim755.0\mu\text{g}/3\text{g} \quad n=8$

最低检出浓度为 0.1008μg/3g, 最低检测量为 10ng。

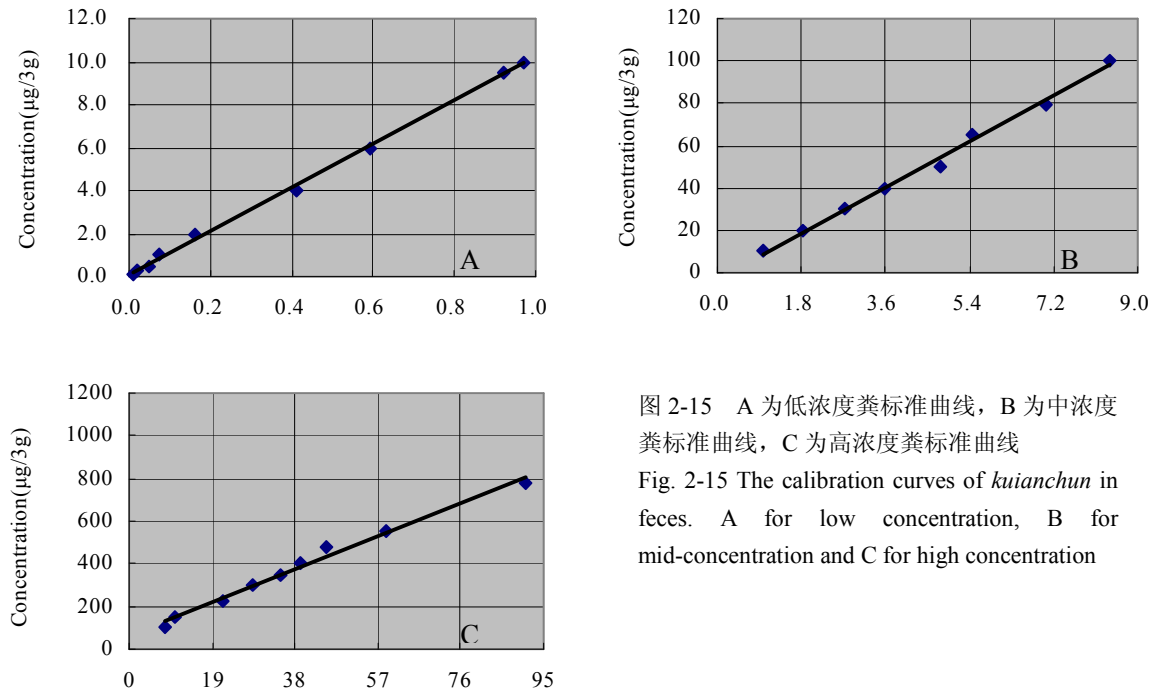


图 2-15 A 为低浓度粪标准曲线, B 为中浓度粪标准曲线, C 为高浓度粪标准曲线
Fig. 2-15 The calibration curves of *kuianchun* in feces. A for low concentration, B for mid-concentration and C for high concentration

表 2-20 粪样品标准曲线
Table 2-20 Parameters of *kuianchun* calibration in feces

样品号 Sequence	浓度(μg/3g) Concentration(μg/3g)	AUC _k /AUC _n	样品号 Sequence	浓度(μg/3g) Concentration(μg/3g)	AUC _k /AUC _n
1	0.1008	0.0109	13	49.9875	4.7907
2	0.2496	0.0198	14	65.1000	5.4736
3	0.4991	0.0496	15	79.8250	7.0253
4	0.9998	0.0715	16	99.9750	8.4203
5	1.9995	0.1634	17	149.9625	10.6052
6	3.9990	0.4119	18	224.7500	21.3034
7	5.9985	0.5936	19	299.9250	28.4204
8	9.5325	0.9233	20	349.9125	34.7148
9	9.9975	0.9721	21	403.7250	39.4004
10	19.9950	1.8526	22	475.8500	45.3628
11	29.9925	2.7376	23	549.4750	59.0081
12	39.9125	3.5823	24	775.0000	90.7063

2.3.2.2.2 粪样品检测精密度与准确度

分别将喹胺醇质控样品配制成浓度为0.9998、1.9995、9.9975、29.9925 $\mu\text{g}/3\text{g}$ 的标准空白粪样品，各三个平行，精确加入内标，样品处理和检测依上法操作分别进行日内和日间精密度和准确度的分析。准确度计算方法如公式2-1，用测得浓度与理论浓度差值的绝对值与理论浓度的比值百分比表示；精密度计算方法如公式2-2，用测得值的标准偏差与理论浓度比值的百分比表示。由表2-22可见，日内精密度RSD为5.33%，日内准确度为24.9%；由表2-23可见，日间精密度RSD为7.71%，日间准确度为25.11%。

表 2-21 粪日内精密度和准确度

Table 2-21 The relative standard deviation (RSD) and accuracy of intra-day in feces						
理论浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$) Theoretical concentration	测得浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$) Calculated concentration	SD	精密度 Precision RSD(%)	MEAN	准确度 Accuracy	MEAN
0.9998	0.6643	0.0492	4.92		33.56	
1.9995	2.3304	0.1327	6.64	5.33	16.55	24.90
9.9975	6.2117	0.2844	2.83		37.87	
29.9925	33.4802	2.0732	6.91		11.63	

表 2-22 粪日间精密度和准确度

Table 2-22 The relative standard deviation (RSD) and accuracy of inter-day						
理论浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$) Theoretical concentration	测得浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$) Calculated concentration	SD	精密度 Precision RSD(%)	MEAN	准确度 Accuracy	MEAN
0.9998	0.7383	0.0568	7.96		26.15	
1.9995	2.2827	0.1156	5.25	7.71	14.16	25.11
9.9975	5.7354	0.5569	9.13		42.63	
29.9925	24.7395	2.1414	8.51		17.52	

表 2-23 粪样品回收率

Table 2-23 Sample Recovery of feces		
标准粪样浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$) Standard concentration in blood($\mu\text{g}/\text{mL}$)	MEAN \pm SD	回收率 (%) Recovery (%)
0.9998	82.26 \pm 2.21	
5.9985	79.07 \pm 2.53	73.33 \pm 4.85
9.9975	72.03 \pm 4.49	
49.9925	59.95 \pm 10.17	

表 2-24 粪方法回收率

Table 2-24 Method recovery of feces		
标准粪样浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$) Standard concentration in blood($\mu\text{g}/\text{mL}$)	MEAN \pm SD	回收率 (%) Recovery (%)
0.9998	95.08 \pm 0.26	
5.9985	86.45 \pm 1.78	83.24 \pm 3.6
9.9975	84.07 \pm 6.22	
49.9925	67.34 \pm 6.14	

2.3.2.2.3 粪回收率测定

分别将喹胺醇质控样品配制成浓度为0.9998、5.9985、9.9975、49.9925 $\mu\text{g}/3\text{g}$ 的标准空白粪样品，各三个平行，精确加入与样品提取时相当量和浓度的内标，依样品处理法和检测操作；再将喹胺醇质控样品配制成上述浓度的流动相溶液，各三个平行，加入相应浓度的内标，上机检测。回收率以测得标准粪样中喹胺醇的曲线面积和测得流动相中相应浓度的喹胺醇的的曲线面积比值的百分比来表示，见公式2-3。如表2-23所示，测得四个浓度的样品回收率由低到高分别为82.26 \pm 2.21%、79.07 \pm 2.53%、72.03 \pm 4.49%、59.95 \pm 10.17%，平均值为72.33 \pm 4.85%。方法回收率

用粪样中喹胺醇标准品曲线下面积和内标曲线下面积的比值与流动相中喹胺醇标准品曲线下面积和内标曲线下面积的比值的百分数表示，见公式2-4。如表2-24所示，测得四个浓度的方法回收率由低到高分别为95.08±0.26%、86.45±1.78%、84.07±6.22%、67.34±6.14%，平均值为83.24±3.60%。

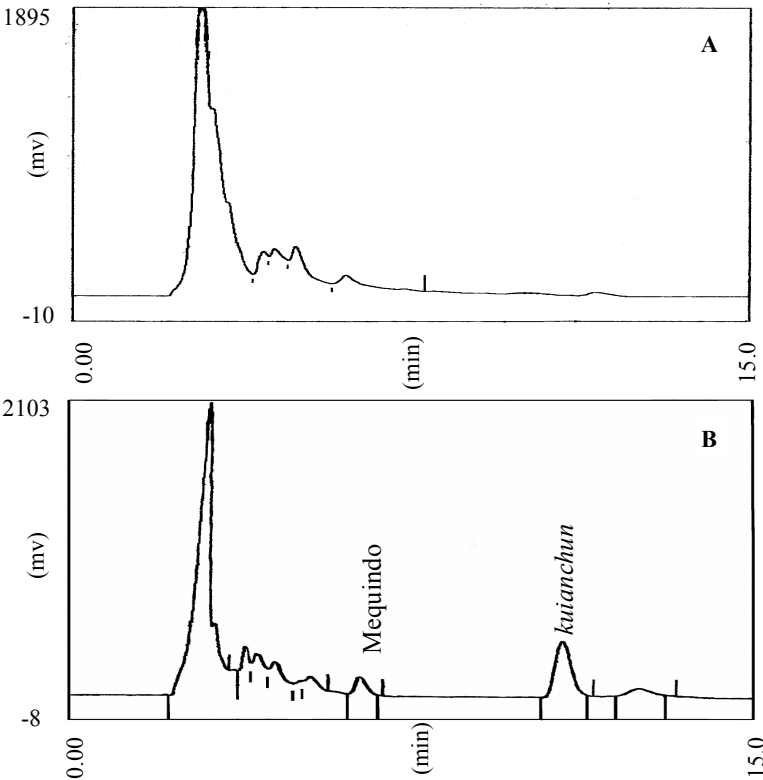


图 2-16 A 为空白粪样的色谱图，B 为口服喹胺醇后的色谱图
Fig. 2-16 Chromatograms for (A) blank feces. (B) feces after oral administration *kuianchun*

2. 3. 2. 2. 4 HPLC线性行为

图 2-16 A 为空白粪样品的 HPLC 色谱图，B 为口服给药后一头猪的粪样品中喹胺醇的 HPLC 色谱图。内标的保留时间为 5.0±1.5 min，喹胺醇的保留时间为 11.0±1.5 min。由图中可以看出，在内标和喹胺醇处，杂质峰对其干扰很小；在喹胺醇峰之后，也有一个小的吸收峰出现，但不明显，与尿和血中的 HPLC 检测结果相似，均可能为同分异构体或代谢产物。

2. 3. 2. 2. 5 粪中喹胺醇含量

由表2-25和图2-17可见，口服喹胺醇后，在12-24h的粪中，喹胺醇原药的浓度最高，36-72h粪中，喹胺醇的浓度很低。粪中喹胺醇的回收率为53.76%。而静脉注射后的试验动物粪中用HPLC法检测不出喹胺醇原药的存在。

表 2-25 口服喹胺醇后粪排泄物中浓度 (μg/3g)

Table 2-25 Concentration of *kuianchun* in feces after oral administration

时间 (h)	1	2	3	4	5	MEAN±SD
0~12	2230.22	3105.78	764.10	14561.93	3145.77	4761.56±5562.98
12~24	39613.15	66877.54	29328.14	22213.28	45124.63	40631.35±17154.28
24~36	1688.24	553.56	757.16	636.51	369.16	800.926±515.72
36~48	64.18	42.99	113.55	95.93	36.44	70.618±33.38
48~72	18.6275	28.5186	2.1242	10.0384	7.6473	13.3912±10.34
72~96	—	—	—	—	—	—
96~120	—	—	—	—	—	—

注：“—”表示未检测到原药喹胺醇

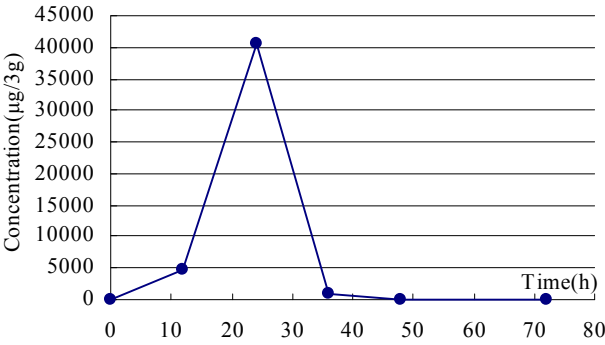


图 2-17 粪样品中喹胺醇浓度随时间变化的曲线

Fig. 2-17 Curve of drug concentration-time in fece after oral administration kuianchun

表 2-26 不同时段粪中喹胺醇的回收量

Table 2-26 Recovery volume of kuianchun in feces at every period time

序号 Sequence	回收总量 (mg) Recovery sum volume					给药量 (mg) Sum drug volume
	0~12h	12~24h	24~36h	36~48h	48~72h	
1	341.22	3327.50	189.65	3.7009	2.4526	5812.37
2	100.41	3522.44	54.62	4.5000	0.8000	5712.27
3	50.43	2639.53	104.74	6.624	0.1862	6615.87
4	1456.19	910.74	30.13	2.3983	0.6023	5983.57
5	285.22	3023.35	14.77	2.58	0.8488	6005.67

表 2-27 不同时段粪中喹胺醇的回收率(%)

Table2-27 Recovery ratio of kuianchun in feces at each period

时点 (h) Time(h)	3	5	6	7	10	MEAN
0~12	5.87	1.76	0.76	24.34	4.75	7.505
12~24	57.25	61.67	39.90	15.22	50.35	44.88
24~36	3.26	0.96	1.58	0.50	0.25	1.31
36~48	0.06	0.08	0.10	0.04	0.04	0.064
48~72	0.04	0.01	0	0.01	0.01	0.014
SUM	66.48	64.48	42.34	40.11	55.4	53.76

2.3.3 讨论

2.3.3.1 HPLC 曲线行为

本试验中猪排泄物粪和尿中的HPLC检测条件仍同血液中喹胺醇的检测一样，选用352nm为检测波长。检测结果显示，尿样和粪样中喹胺醇原药的保留时间各个样品间有一定差异，即使同一样品不同提取批次也存在较大差异，如尿样提取物中喹胺醇的保留时间一般在6.49~8.40 min之间，粪样中喹胺醇的保留时间误差范围为±1.5min。但由图2-13和图2-16可见，在内标和喹胺醇吸收峰附近，并无其它明显的杂质峰影响，这说明保留时间的误差不会影响药物检测的准确度。

2.3.3.2 方法稳定性

尿标准曲线的制作分两个范围，相关系数比较理想，R²分别为0.9706和0.9936，但最低检出浓度较高为0.2784/2mL。日内和日间精密度假RSD分别为4.36%和7.49%，均小于8；准确度分别为12.61%

和16.75%。但尿样的方法回收率和样品回收率均较低，分别为20.72%和17.61%。该结果提示，本实验方法虽然可在尿样中检测出喹胺醇原药的存在，但方法相关指标均较低，没有达到药物分析所要求的指标。因此，对喹胺醇在尿液中的排泄量的检测还需大量实验，进行尿样中喹胺醇最佳提取方法的摸索。

粪样标准曲线用了三个浓度范围，从低到高的相关系数 R^2 分别0.9983、0.9956、0.9898，较为理想，最低检出浓度为0.1008 $\mu\text{g}/3\text{g}$ ，可见检测灵敏度和稳定性较尿样好。粪样品中喹胺醇的提取率为72.33%，方法回收率为83.24%；日内和日间精密度RSD分别为5.33%、7.71%，日内和日间准确度分别为24.9%和25.11%。可见，粪样品的处理方法和检测方法虽然不及血液样品中喹胺醇的RP-HPLC检测，但优于尿样提取方法。

2.3.3.3 喹胺醇的排泄

外源性药物无论是通过血管外给药，还是血管内给药，进入机体后的消除（elimination）一般依靠二种途径：一是不经任何代谢转化而直接以原药的形式排出体外；另一种是在肝脏等组织中，经代谢酶催化作用，代谢转化而产生新的物质，代谢物部分可能仍然以原型、部分可能以其它代谢物的形式排出体外。药物消除是研究药物体内过程的一个重要方面，它和吸收（absorption）、分布（distribution）、代谢（metabolism）一起组成了药物代谢全过程。消除的药物一般排出体外。通常药物排泄（excretion）有三条途径：经肾随尿排出、随胆汁排出、随粪便排出。

本实验结果表明，喹胺醇进入机体后，被吸收的药物有一部分经过肾脏以原药的形式随尿排出体外，但尿中喹胺醇的浓度很低，在8~12h之间尿药浓度最高为10.10mg/2mL。口服300mg/kg体重的喹胺醇后，原药在尿中的变化曲线与血药浓度-时间曲线相似，但达峰时间相对滞后，同时在24~36h之间又出现了一个小峰（见图2-14），即有双峰现象，具体原因有待进一步研究。喹胺醇随尿的排泄率为0.31%，可以忽略不计。分析认为可能性的原因：（1）喹胺醇以原药的形式随尿排泄本身就很少，主要途径不是经肾随尿排泄；（2）由于样品的前期处理方法回收率低，可能导致检出率也很低；（3）喹胺醇可能转化为其它代谢物经肾脏排泄；（4）喹胺醇的生物利用度低。同类药物喹烯酮也有这种现象，即用HPLC法检测不到喹烯酮在尿中以原药的形式存在或浓度很低（李剑勇，2001）。这与喹诺酮类药物的排泄不同，喹诺酮类药物大部分是经肾脏随尿排出体外（李建晴，2002）。

猪单剂量口服喹胺醇后，粪样中药物浓度较高，12-24h的粪样品中喹胺醇原药浓度最高可达40.63mg/3g。粪样品中喹胺醇的排泄高峰期比尿中的排泄高峰期滞后4h。喹胺醇从粪中排泄的总量占总给药量的53.76%。这表明口服给药后约50%的喹胺醇以原药随粪便直接排出体外；也可能粪中的部分药物是随胆汁进入肠道和粪便一起排出，需具体实验数据验证。据报道，口服喹烯酮后随粪便排出的药量占总给药量的90%以上，这与本试验中喹胺醇随粪排泄量有较大差距（李剑勇，2001）。口服喹胺醇后，除随粪和尿排出54%的原药外，还有46%的喹胺醇可能转化为其它产物而被代谢，但尚无法用目前的研究数据证明，推测可能是在机体内被转化为其它代谢物，并被消除。因此，进一步研究喹胺醇的体内外生物转化非常必要。

综上所述，喹胺醇的排泄主要依靠胃肠道直接排出体外；试验动物吸收的喹胺醇部分可以经肾脏随尿排出体外；部分药物进入机体后，可能转化为中间代谢产物被试验动物重新利用或被排泄。

2.4 多剂量口服喹胺醇在鸡体内药代动力学研究

2.4.1 材料与方法

2.4.1.1 药品与试剂

喹胺醇原料药由中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所新兽药研究室提供, 经本实验纯结晶纯化后, 纯度为99.7%, 作为试验用药, 将其装入胶囊, 供试; 纯结晶16次后, 检测其纯度达99.97%, 作喹胺醇标准品使用; 乙酰甲喹, 由中国兽药监察所提供; 乙腈、甲醇为HPLC级(天津化工试剂公司); 其余试剂均为国产分析纯。

2.4.1.2 实验动物

35日龄健康AA肉仔鸡16只, 体重 1.5 ± 0.3 kg, 购自甘肃省华陇种鸡场, 正常免疫。试验鸡购来后, 在本试验室动物房饲喂适应15d之后, 再进行正式试验。实验饲料为自配, 主要组成有玉米、豆粕、棉粕、菜粕、油等, 不添加任何其它药物, 自由饮水。

2.4.1.3 给药途径

每只鸡给药前12h禁食不禁水。喹胺醇胶囊放入舌根, 让其自然吞咽, 剂量为100 mg/kg 体重, 连续用药7d。

2.4.1.4 采样

分别在最后1次给药后的0.5h、1h、2h、4h、8h、12h、16h、24h、36h、48h从翅静脉采血2.5mL, 肝素抗凝, 2 800 rpm离心15min, 分离血浆, -20°C 冰箱保存待用。

2.3.1.5 测试条件

Agilent 1100型高效液相色谱仪系列: Agilent分析型泵系统G1312A, G1315A/B二极管阵列检测器(DAD)检测器, G1313A微盘式自动进样器, G1316A柱温箱, CAG Bootp Server数据采集、控制和处理工作站; Agilent系列ZORBAX Eclipse XDB C18色谱柱(256×4.6 mm, $5\mu\text{m}$); 流动相为乙腈-水(40:60), 流速 $1.0\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温 $30.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, 检测波长352nm, 内标为乙酰甲喹。

2.3.1.6 样品处理

(1) 准确取血浆样品1.0 mL, 精确加入内标乙酰甲喹(浓度 $60\mu\text{g}/\text{mL}$) $100\mu\text{L}$, 涡旋振荡5 min; (2) 加 $100\mu\text{L}$ 0.1mol/L 的盐酸, 涡旋振荡5 min; (3) 加1.0 mL饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 涡旋振荡10 min; (4) 加提取液(乙腈: 乙酸乙酯: 异丙醇=60: 40: 4) 4.0 mL, 涡旋振荡20 min; (5) 4 000 rpm离心20 min, 取上层有机相于棕色离心管中; (6) 余液加4.0 mL提取液, 涡旋振荡20 min; (7) 4 000 rpm离心20 min, 取上层有机相于前棕色离心管中; (8) 余液加2.0 mL提取液, 涡旋振荡20 min; (9) 4 000 rpm离心20 min, 取上层有机相于前棕色离心管中; (10) 合并三次提取的有机相, 60°C 水浴氮气缓慢吹干; (11) 残渣 -20°C 保存待测; (12) 整个过程避光操作; (13) 测定前, 将残渣用流动相 $500\mu\text{L}$ 溶解, 用 $0.22\mu\text{m}$ 的针筒式过滤器过滤后, 取 $20\mu\text{L}$ 进样, RP-HPLC检测。

2.3.1.7 数据处理

实验数据采用中国农业科学院原中兽医研究所编制的MCPKP药代动力学程序处理, 求得各例的药代动力学参数及平均值, 比较动力学特征参数。

2.4.2 结果

2.4.2.1 线性范围与检测灵敏度

采用内标法，分别建立低、高两个浓度范围，浓度分别为 0.020~0.600μg/mL、0.6~6.40μg/mL 见表 2-30。分别在 14 个试管中，准确量取 1.0mL 空白血浆，按设计浓度分别加入喹胺醇标准品，分别涡旋振荡 20min 后。再按上述样品提取过程分别处理，做 RP-HPLC 测定。以喹胺醇标准品曲线下面积和内标曲线下面积比值与喹胺醇标准品浓度间进行线性回归，标准曲线见图 2-18 和图 2-19，线性方程分别如下：

$$Y=0.8068X-0.0075 \quad R^2=0.9900, \quad n=8 \quad (0.020\sim0.600\mu\text{g/mL})$$

$$Y=0.8569X+0.1200 \quad R^2=0.9919, \quad n=7 \quad (0.60\sim6.40\mu\text{g/mL})$$

最低检出浓度为 0.0200μg/mL，最低检测量为 10ng。

2.1.2.2 精密度和准确度试验

分别将喹胺醇质控样品配制成浓度为0.06、0.40、1.60、6.40μg/mL的标准血浆样品各三个平行，配制0.04、0.20、1.00、4.80μg/mL的标准血浆样品各三个平行，精确加入内标，样品处理和检测依上法操作，分别进行日内、日间精密度和准确度的分析。准确度计算方法如公式2-1，是用测得浓度与理论浓度差值的绝对与理论浓度的比值百分数表示；精密度计算方法如公式2-2，用测得值的标准偏差与理论浓度比值的百分数表示。由表2-31可见，日内精密度RSD为3.36%，日内准确度为15.23%；由表2-32可见，日间精密度RSD为2.84%，日间准确度为6.58%。

2.1.2.3 回收率测定

分别将喹胺醇质控样品配制成浓度为 0.32、1.60、4.80、12.80μg/mL 的标准血浆样品，各三个平行，精确加入与样品提取时相当量和浓度的内标，依样品处理法和检测操作。回收率以测得标准血样的曲线下面积和测得流动相中相应浓度的样品的曲线下面积比值的百分比来表示，见公式 2-3。如表 2-28 所示，测得四个浓度的样品回收率由低到高分别为 76.77±14.91%、62.37±12.06%、73.47±7.22%、72.53±8.95%，平均值为 71.29±5.80%。方法回收率用血样中喹胺醇标准品曲线下面积和内标曲线下面积的比值与流动相中喹胺醇标准品曲线下面积和内标曲线下面积的比值的比值的百分数表示，见公式 2-4。如表 2-29 所示，测得四个浓度的方法回收率由低到高分别为 125.51±10.05%、95.42±9.46%、101.45±9.65%、110.79±6.72%，平均值为 108.29±14.25%。

表 2-28 粪样品回收率

Table 2-28 Sample Recovery of feces

标准粪样浓度(μg/mL) Standard concentration in blood(μg/mL)	MEAN±SD	回收率 (%) Recovery (%)
0.32	76.77±14.91	71.29±5.80
1.60	62.37±12.06	
4.80	73.47±7.22	
12.80	72.53±8.95	

表 2-29 粪方法回收率

Table 2-29 Method recovery of feces

标准粪样浓度(μg/mL) Standard concentration in blood(μg/mL)	MEAN±SD	回收率 (%) Recovery (%)
0.32	125.51±10.05	108.29 ±14.25
1.60	95.42±9.46	
4.80	101.45±9.65	
12.80	110.79±6.72	

表 2-30 标准曲线浓度
Table 2-30 The concentration of calibration

序号 Sequence	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
浓度 (μg/mL) Concentration (μg/mL)	0.020	0.040	0.060	0.080	0.100	0.200	0.400	0.600	0.800	1.000	1.600	2.400	4.800	6.400
AUC _k /AUC _i	0.0429	0.0535	0.0642	0.1172	0.1239	0.2626	0.5546	0.7141	0.9111	0.9419	1.4669	2.9117	5.1099	7.5037

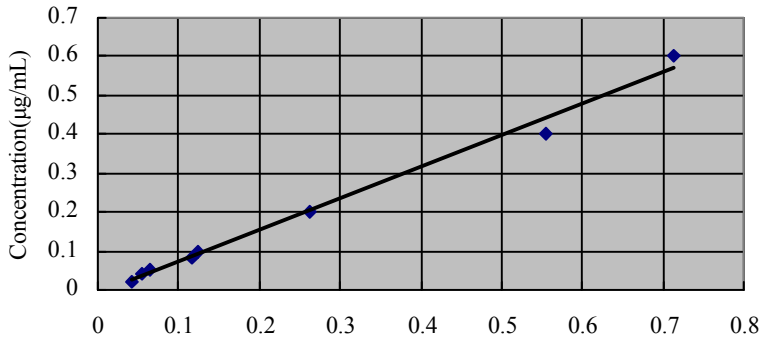


图 2-18 低浓度标准曲线
Fig. 2-18 The calibration curves of low concentration

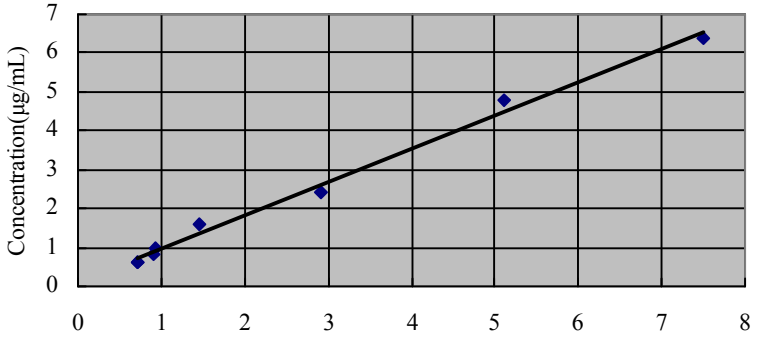


图 2-19 高浓度标准曲线
Fig. 2-19 The calibration curves of high concentration

表 2-31 日内精密度和准确度
Table 2-31 The relative standard deviation (RSD) and accuracy of intra-day

理论浓度 (μg/mL) Theoretical concentration	测得浓度 (μg/mL) Calculated concentration	SD	精密度 Precision RSD(%)	MEAN	准确度 Accuracy	MEAN
0.06	0.0465	0.0024	5.17		33.56	
0.40	0.4430	0.0061	1.39	3.36±2.27	16.55	13.29±8.27
1.60	1.3322	0.0731	5.49		37.87	
6.40	6.6031	0.0931	1.41		11.63	

表 2-32 日间精密度和准确度
Table 2-32 The relative standard deviation (RSD) and accuracy of inter-day

理论浓度 (μg/mL) Theoretical concentration	测得浓度 (μg/mL) Calculated concentration	SD	精密度 Precision RSD(%)	MEAN	准确度 Accuracy	MEAN
0.04	0.0352	0.002	5.72		12.12	
0.20	0.2049	0.0017	0.83	2.84±2.72	2.44	6.58±4.07
1.00	0.9478	0.0436	4.60		5.22	
4.80	4.4870	0.0103	0.23		6.52	

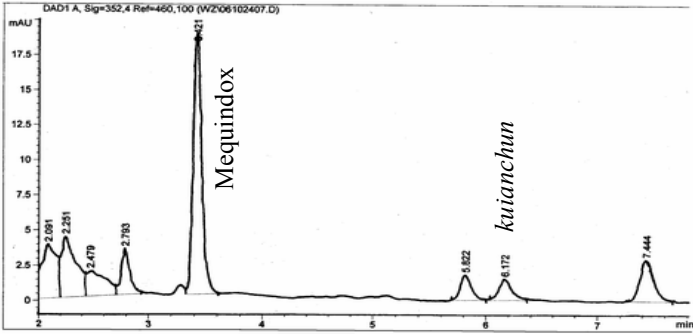


图 2-20 最后一次口服喹胺醇 8h 的血浆 HPLC 曲线

Fig. 2-20 Chromatograms for the plasma obtained from a pig at 8 h after the last time of oral administration at 100 mg/kg *kuianchun*

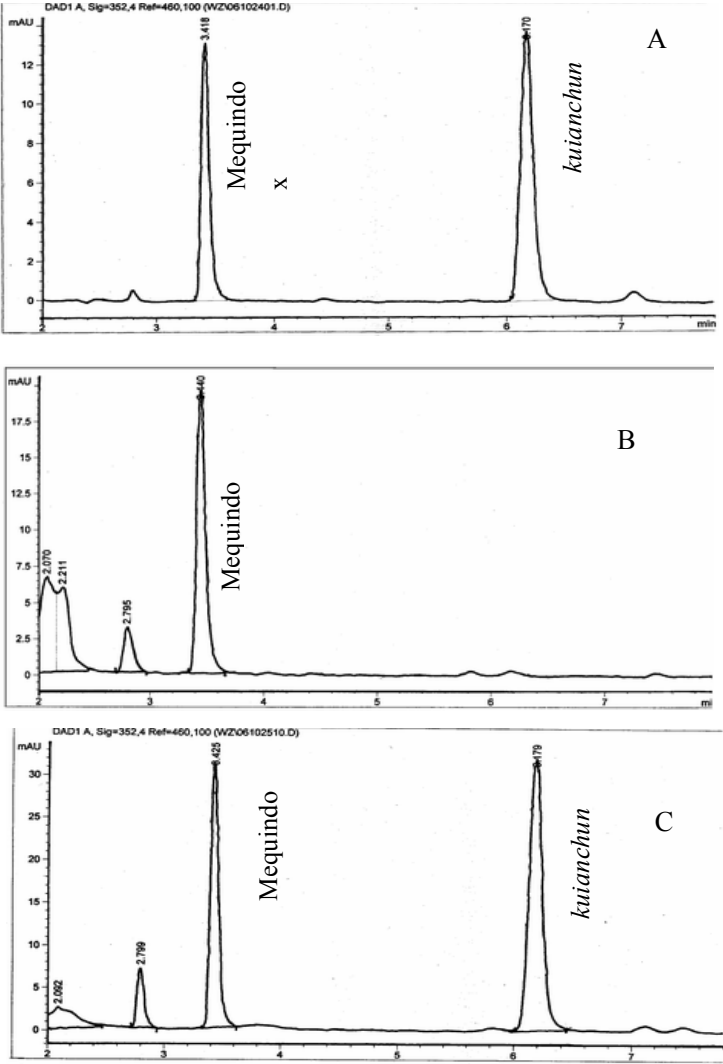


图 2-21 A 为流动相中喹胺醇和内标乙酰甲喹的 HPLC 曲线；B 为空白血浆中内标乙酰甲喹的 HPLC 曲线；C 为空白血浆中喹胺醇和乙酰甲喹的 HPLC 曲线

Fig. 2-21 Chromatograms for (A) mobile phase with internal standard and *kuianchun* standard (B) blank plasma with internal standard (C) blank plasma with internal standard and *kuianchun* standard

2. 1. 2. 4 HPLC线性行为

图2-20是最后一次给药8h的一只鸡的血浆样品中提取的醇胺醇和内标的HPLC扫描曲线，由

图上可见，在喹胺醇的吸收峰前后分别出现了两个新的吸收峰，保留时间分别为5.82min和7.44min。图2-21所示，A为流动相中的喹胺醇和内标乙酰甲喹的HPLC色谱图，无杂质峰，喹胺醇的保留时间为6.190 min左右，内标的保留时间为3.426 min左右；图B、C分别是空白血浆加内标和空白血浆加喹胺醇的HPLC图谱。在喹胺醇和内标乙酰甲喹保留时间附近无干扰峰存在，图2-21C与图2-20的不同是没有5.82min和7.44min两个吸收峰。

2. 1. 2. 5 血药浓度

药代动力学分析结果显示，鸡连续口服喹胺醇后，药代动力学模型符合二室数学模型，血药浓度测得值2h最高为0.4519μg/mL，24h之后再检测不到喹胺醇原药的存在。

表 2-33 鸡连续口服喹胺醇 7d 后血药浓度（单位：μg/mL）

Table 2-33 Drug concentration-II in plasma after 7 days by oral administration at dose of 100 mg/kg

时间 Time(h)	样本数(n) Number(n)	观察值 Observed value	拟合值 Estimated value
0.5	16	0.3201±0.0136	0.2007±0.0875
1	16	0.3824±0.0544	0.2802±0.0495
2	16	0.4519±0.1817	0.3071±0.0382
4	16	0.3874±0.0205	0.2508±0.088
8	16	0.1554±0.0077	0.1430±0.0387
12	16	0.0381±0.0066	0.0801±0.0178
16	16	0.0288±0.0027	0.0449±0.0079
24	16	0.0251±0.0067	0.0142±0.0013

2. 1. 2. 6 药时曲线

鸡连续7d口服喹胺醇后，药时曲线的变化趋势和药代动力学模型有两种变化，一组符合二室动力学模型的，一组符合一室模型，均在24h后检测不到原药的存在。由于多数鸡呈二室模型(图2-22)，所以暂定为鸡多次口服100mg/kg的喹胺醇的药代动力学数学模型为二室开放模型。观察值和拟合值间的相关系数分别为 $R^2=0.9037$ 和 $R^2=0.9638$ 。拟合值和观察值重复性不是很好。

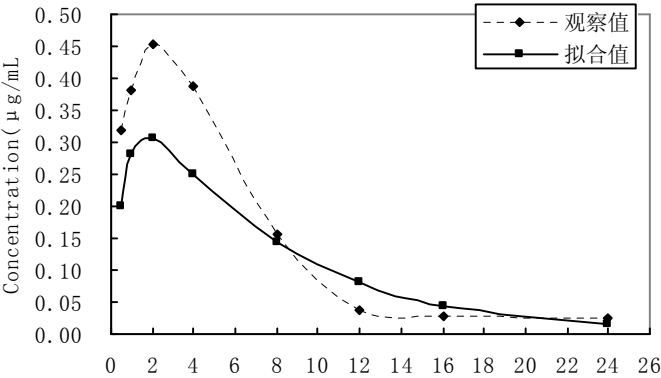


图 2-22 鸡连续口服喹胺醇后的药时曲线-I

Fig. 2-22 Fitting curve of concentration time profile of *kuianchun* in plasma after continuously oral administration in broiler

2.1.2.7 药代动力学参数

由表2-34可见，鸡连续口服喹胺醇7d后，符合二室模型。吸收半衰期 $T_{1/2ka}$ 为0.8034h，分布半衰期 $T_{1/2\alpha}$ 为2.0908h，消除半衰期 $T_{1/2\beta}$ 为33.1911h，达峰时间 T_p 为1.7767h，峰浓度 C_{max} 为0.4736 $\mu\text{g/mL}$ ，曲线下面积AUC为1.1525 $\text{mg/L}\cdot\text{h}$ 。

表 2-34 鸡连续口服喹胺醇后药代动力学参数—I

Table 2-34 Parameters-I of *kuianchun* pharmacokinetics after continuously oral administration in broiler

药动学参数	单位	MEAN \pm SD
Dose	mg /kg	100.0
Co	$\mu\text{g} / \text{ml}$	0.8581 \pm 0.1881
A	$\mu\text{g/mL}$	1.5166 \pm 0.3633
B	$\mu\text{g/mL}$	0.0435 \pm 0.0113
α	/h	0.3317 \pm 0.0117
β	/h	0.0303 \pm 0.0017
Ka	/h	1.1442 \pm 0.1179
K12	/h	0.1255 \pm 0.0792
K21	/h	0.0482 \pm 0.0087
KeL	/h	0.1884 \pm 0.0613
Lagtime	h	0
$T_{1/2Ka}$	h	0.8034 \pm 0.4207
$T_{1/2\alpha}$	h	2.0908 \pm 0.0723
$T_{1/2\beta}$	h	33.1911 \pm 7.7060
AUC	$\text{mg/L}\cdot\text{h}$	1.5125 \pm 0.3086
T_p	h	1.7767 \pm 0.5939
C_{max}	$\mu\text{g/mL}$	0.4736 \pm 0.0791
TCP(ther)	h	0

2.3.3 讨论

2.3.3.1 RP-HPLC保留时间和吸收峰

仍采用与猪单剂量口服喹胺醇同样的检测方法和条件，用内标法，以乙酰甲喹为内标参考物，流动相、提取液和提取方法均相同，流速等都为1min，柱温 $30\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ ，但检测仪器不同。本实验所用仪器为Agilent 1100系列，均为自动控制装置。在试验之前，对检测波长亦先做了紫外扫描波

长分析，仍是波长352nm处光吸收度较好。RP-HPLC测试结果亦显示在波长352nm条件下曲线下面积和峰高均优于255和236nm，因此仍采用352nm做为RP-HPLC的检测波长。

由图2-20, 21可见，内标乙酰甲喹的保留时间为 $3.40 \pm 0.45 \text{ min}$ ，目标检测物喹胺醇的保留时间为 $6.19 \pm 0.40 \text{ min}$ 。在内标乙酰甲喹和喹胺醇吸收峰处未见有其它杂质吸收峰重叠。可见，无论是用Waters 486检测体系还是用Agilent 1100检测体系，本研究所建立的实验方法比较稳定，可以作为该药的标准制定参考方法，喹胺醇原药的检测波长可定为352nm。这与文献报道多数喹啉类药物的检测波长在300~380nm之间相似（莫正宗，1997）。

2.2.3.2 鸡多剂量口服喹胺醇药代动力学模型

前文的实验结果显示，猪单剂量口服喹胺醇后，药物代谢动力学模型符合一级一室开放模型。本实验中，每天给鸡口服剂量为 100 mg/kg 体重的喹胺醇，连续7d。最后一次给药后的0.5-48h，共采集了8个时间点的血浆样品，检测了血药浓度。用MCPKP软件进行房室模型的模拟结果显示，16只试验鸡中，有10只鸡的药代动力学符合二室代谢模型，而有6只鸡的药代动力学模型与猪的一样属一级一室开放模型。药代动力学数学模型分别可用公式2-8表示。从试验结果推测，药代动力学模型可能为二室模型。孙永学等报道（孙永学, 1998），给鸡连续饲喂 120 mg/kg 体重的喹乙醇后，其药代动力学模型和本实验结果相似。

$$C = 1.5166e^{-0.3317t} + 0.0435 e^{-0.0303t} \quad \text{公式 2-8}$$

2.2.3.3 鸡多剂量口服喹胺醇后药代动力学特征

符合二室模型，动力学参数结果如表 2-34 所示，吸收半衰期 $T_{1/2ka}$ 为 0.8034 h，分布半衰期 $T_{1/2\alpha}$ 为 2.0907h，消除半衰期 $T_{1/2\beta}$ 为 33.1991h。该结果表明喹胺醇在鸡体内的吸收和分布均较快，这与猪单剂量口服 300 mg/kg 体重喹胺醇后的吸收和分布相似。但是，消除相比猪单剂量用药慢，这可能与多剂量给药有关。达峰时间 T_p 为 1.7767 h，最高浓度 C_{max} 为 $0.4736 \mu\text{g/mL}$ ，曲线下面积 AUC 也只有 1.5125 mg/L.h 。结果表明喹胺醇在鸡体内的吸收和生物利用率与猪单剂量口服后一样。上述动力学参数均与鸡多次口服喹乙醇后的动力学参数相近（孙永学，1998），但曲线下面积比喹乙醇小，可能与生物利用率低有关。

2.3.3.4 试验方法

本实验采用内标法，日内精密性RSD为3.36%，日内准确度为15.23%；日间精密性RSD为2.84%，日间准确度为6.58%。回收率用样品回收率和方法回收率进行了评估，结果显示二者分别为 $76.77 \pm 14.91\%$ 和 $108.29 \pm 14.25\%$ 。由于本试验中血药浓度较低，因此采用高、低两个浓度范围进行了标准曲线的制作，低浓度标准曲线的 $R^2=0.9900$ ，高浓度的标准曲线 $R^2=0.9919$ 。由此可见，该试验方法比较稳定，但样品回收率仍和猪的药代学一样均为70%左右。样品的前处理在以后试验中还需继续摸索。

第三章 喹胺醇对大鼠肝细胞色素 P450 酶的影响研究

细胞色素 P450 酶系包括细胞色素 P450 (Cytochrome P450, CYP450) 和细胞色素 b5(Cytochrome b5, Cyt b5), 是生物体一类重要的活性酶, 其活性中心有含铁血红素和半胱氨酸, 因此属血红素酶类, 是 B 族红细胞色素(冷欣夫, 2001)。还原型 CYP450 酶可与一氧化碳(CO)反应而形成复合物 CYP450-CO, 并在波长 450nm 处有一强的吸收峰, 故而得名 CYP450(Ross A, 2000)。多种动物、植物、微生物体内都含有大量 CYP450, 它是微粒体混合功能氧化酶系(microsomal mixed-function oxidase system, MFO)中最重要的一类, 在机体的许多生理功能活动中发挥着非常重要的作用(许华夏, 2002)。CYP450 是一个超基因家族, 目前已发现的哺乳动物 CYP450 有 14 个基因家族, 26 个亚基因家族, 主要有 CYP1-CYP4 四大家族, 其中最多的有 CYP1A、CYP2A6、CYP2D6、CYP2C、CYP2E1 和 CYP3A 等。它们主要分布在肝、肾等器官中, 不同基因型或亚型在机体内所占比例不尽相同, 其作用也不一样。

CYP450 是机体内参与药物 I 相代谢的主要酶组成员, 当外源性化合物(Xenobiotics)进入机体后, 它可催化其发生氧化、还原、水解等反应, 从而转变成带氧的极性基团。该过程不但可改变原有的功能基团, 而且可能会产生新的水溶性功能基团如-OH、-SH、-NH、-COOH 等, 并为 II 相代谢做准备。可见, CYP450 在药物或毒物的体内生物转化、活性作用发挥、解毒等过程中起着决定性作用(夏世钧, 2001)。一般认为, CYP450 酶是药物在体内代谢关键酶, 也叫限速酶, 其水平的高低与药物代谢速率、清除率密切相关, 影响着药物的生物利用度, 是药代动力学和药效学个体差异的根本所在(金念祖, 1995; Venkatakrishnan, 2002)。研究认为, 如果某种药物代谢相关的 CYP450 缺乏或受抑制, 血药浓度可能会升高、半衰期会延长, 也有导致中毒的现象; 如果两种药物同时应用, 一种药对另一种药物的代谢酶有抑制作用时, 会影响其在机体内的代谢过程和药效发挥(Hersh EV, 2004)。有些药物本身并无活性或毒性, 但经体内酶 CYP450 等的作用而发生代谢转化后, 会转变成有生物活性或毒性的代谢产物, 如氯胍需要在体内经 CYP2C19 代谢生成环氯胍后才能发挥抗疟作用(Lu AH, 2000)。另外, 如某些前致癌物(procarcinogen)和前毒物(protoxin)在 CYP450 酶(CYP2E1 或 CYP1A1 等)的作用下发生代谢活化, 形成亲电性中间产物, 可与细胞内大分子物质如 DNA、RNA、蛋白质相互作用后形成加合物, 从而损伤细胞结构(如诱导细胞凋亡、组织坏死等), 并致功能紊乱, 甚至有诱发肿瘤和癌症的可能, 如工业和家庭常用的化学溶剂和环境污染芳香族化合物苯、苯胺、乙醚、亚硝酸、卤烷、卤烯类等, 本身无毒性, 但在体内经 CYP2E1 催化氧化后(Pentiuk OO, 2004)可能会生成毒性代谢物或潜在致癌物, 又如黄曲霉素 B1 及其它一些前致癌物在 CYP3A4 催化下形成活性代谢中间物, 并有诱发肿瘤的可能(Kamdern LK, 2006)。所以, 研究药物对 CYP450 的影响, 对药物在体内的代谢过程的阐述、毒性评价、临床安全和合理用药具有重要意义。

喹胺醇是一种兽用新型抗菌促生长类药, 属喹啉类不同侧链结构的衍生化合物, 其对大肠埃希氏菌、沙门氏菌等有明显抑菌效果, 对雏鸡白痢、仔猪黄痢预防效果高于喹乙醇 15-20% (张力, 2001; 梁剑平, 2001)。前期研究结果显示该药毒性作用低于同类产品, 抗菌促生长效果较好, 有良好的市场前景。喹胺醇作为一种新型兽药, 市场前景良好, 但据报道其同类产品卡巴氧、喹乙醇等有诱导突变等潜在毒性作用, 可见深入研究喹胺醇的毒理学或药理学非常重要。因此, 为了探索喹胺醇的作用机制, 为临床安全、合理用药提供科学依据, 本实验就其对大鼠 CYP450

酶系及相关亚型 CYP1A、CYP2E 和 CYP3A 在基因水平和蛋白活性水平上做了初步研究。

3.1 喹胺醇对大鼠细胞色素 P450 酶亚型 mRNA 表达水平的影响

3.1.1 材料和方法

3.1.1.1 主要试剂

总 RNA 提取试剂盒 (TAKARA, B702-1), RT-PCR 一步法试剂盒 (TAKARA, B3201-1), DNA Marker DL2000 (TAKARA, CD4101), 焦碳酸二乙酯 DEPC (BBI, 1221S05), 琼脂糖 (OXLID LIMITED, 848674-02), EDTA (BBI, 0919S05), Tris (上海生工, AMRESCO 分装, 3044B19), 溴化乙锭 EB (SIGMA 分装, E8751), 6×Loading Buffer (大连宝生物, A134), 其余试剂均为国产分析纯。

3.1.1.2 主要仪器

BIO-RAD MyCycler 梯度 PCR 仪 (美国), BIO-RAD Gel Doc EQ 电泳凝胶成像系统 (美国), BIO-RAD PowerPac 3000 电泳仪 (美国), METTLER TOLEDO AX205 电子分析天平 (瑞士), METTLER TOLEDO AL204 电子分析天平 (瑞士), Ilshin IF300-150 制冰机 (韩国), BECKMAN J2-21M 高速冷冻离心机 (美国), BECKMAN J6-HC 低速冷冻离心机 (美国)。

3.1.1.3 试验药物

喹胺醇原料药由中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所新兽药工程实验室提供, 经本实验室纯结晶纯化后, 纯度为 99.97%。

3.1.1.4 试验动物

30 只雄性 Wistar 大鼠, 体重 180±30g, 购自兰州军区陆军总医院实验动物中心。随机分为 5 组, 分别为高剂量组 (I)、较高剂量组 (II)、中剂量组 (III)、低剂量组 (IV) 和对照组 (C)。

3.1.1.5 试验饲料

试验饲料为大鼠专用饲料, 购自兰州军区陆军总医院实验动物中心, 未添加任何其它药物。自由采食、自由饮水。

3.1.1.6 给药剂量

将喹胺醇用 2% 的吐温-80 助溶, 再用蒸馏水配制成不同浓度的混悬液, 剂量和浓度见表 3-1。对照组用 0.9% NaCl 代替喹胺醇药液。

表 3-1 药物浓度和给药剂量
Table 3-1 Drug concentration and dose

组别 Group	给药剂量 (mg/kg.体重) Drug dose (mg/kg.BW)	饲料添加量 (mg/kg.饲料) Additive dose (mg/kg.diet)	浓度 (mg/mL) Concentration(mg/mL)
I	400	2880	60
II	200	1440	30
III	100	720	15
IV	50	360	7.5

3.1.1.7 给药方法

按每天 25g 体重 0.1mL 药液, 分别给不同组大鼠灌胃相应剂量的喹胺醇混悬液, 连续 7d。

每天称量试验鼠体重，以确定给药量。对照组灌胃等体积的 0.9%NaCl 溶液。

3.1.1.8 研究内容

- (1) 喹胺醇对 CYP1A1 mRNA 表达水平的影响
- (2) 喹胺醇对 CYP2E1 mRNA 表达水平的影响
- (3) 喹胺醇对 CYP3A1 mRNA 表达水平的影响

3.1.1.9 引物

引物设计参照参考文献（余爱荣，2004；辛华雯，2004；），由大连宝生物公司合成，分别见表 3-2

表 3-2 引物及扩增片段长度
Table 3-2 Primers and gene fragments size

基因	上游引物	下游引物	片段长度
Gene	5'Sense primer(5→3)	3'Antisense primer(5→3)	Fragment size (bp)
CYP1A1	CTGGTTCTGGATACCCAGCTG	CCTAGGGTTGGTTACCAGG	331
CYP2E1	CTCCTCGTCATATCCATCTG	GCAGCCAATCAGAAATGTGG	473
CYP3A1	ATCCGATATGGAGATCAC	GAAGAAGTCCTTGTCTGC	597
β-actin	CACGATGGAGGGGCCGACTCATCTAAAGACCTCTATGCCAACACAGT		240

3.1.1.10 检测方法

3.1.1.10.1 肝分离

最后一次给药后，禁食 12h 不禁水。然后断头处死试验鼠，分离肝脏，切成小块，体积为 1cm³，立即用 RNase-Free 0.9%生理盐水冲洗数次，用铝箔包裹，置液氮中速冻，后保存于-80℃低温冰箱中以备用。

3.1.1.10.2 总 RNA 提取

(1)肝组织样处理:取冰冻肝组织样品 100mg,在液氮中研磨成粉后,立即加入 0.5mL RNAiso 试剂,充分研磨后,转入匀浆器中;再用少许 RNAiso 试剂充分冲洗肝脏粉末,并转入匀浆器;冰浴中充分匀浆,至无明显颗粒呈透明状即可;匀浆液转移至 2.0mL 离心管,室温放置 5min;12 000g, 4℃, 离心 5min; 上清液转移至 2.0mL 离心管中。(2)总 RNA 提取:加 0.4mLCHCl₃,充分振荡,至乳化溶液呈乳白色(无分相)后,室温静置 5 min; 12 000g, 4℃, 离心 15min; 取上层无色水相,约 0.7mL 转移至 1.5mL EP 管中,切忌吸出白色中间层;加入等体积异丙醇,颠倒离心管数次使之彻底混匀,室温静置 10min,至 RNA 沉淀形成完全;12 000g, 4℃, 离心 10min。(3)RNA 沉淀洗涤:弃上清,沿管壁缓慢加入 75%乙醇 1.0mL,轻轻颠倒洗涤管壁,漩涡清洗 RNA 沉淀;12 000g, 4℃, 离心 5min,充分弃去乙醇。(4)RNA 溶解:沉淀真空抽干,约用时 5min,充分挥发 RNA 沉淀中过量乙醇;用适量 DEPC 处理过的不含 RNA 酶的水溶解 RNA 沉淀,用移液枪轻轻吹打,使之充分溶解,转置-80℃低温冰箱保存备用。

3.1.1.10.3 RNA 质量鉴定

(1)光密度法:取总 RNA 1.0μL, TE 缓冲液 20 倍稀释,分别在紫外分光光度计上测定 260nm、280nm、320nm 处的吸光度 OD 值,用 OD_{260nm}/OD_{280nm} 初步估算 RNA 的纯度。

RNA 浓度依下式计算:

$$\text{RNA 浓度} (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = (\text{OD}_{260} - \text{OD}_{320}) \times \text{稀释倍数} \times 0.04\mu\text{g}/\mu\text{L}$$
 公式 3-1

(2) 凝胶电泳法: 1%琼脂糖浓度; 0.5%TBE 电泳缓冲液; 2 μ L 加样缓冲液; 5 μ L RNA 上样量; 200V 电压, 冰浴电泳 8min, 即溴酚蓝跑到凝胶 1/5, EB 染色 3min

3.1.1.10.4 RT-PCR 扩增反应

TaKaRa 一步法 RNA PCR KIT(AMV)试剂盒法。

(1) 10 \times One Step RNA PCR buffer 5 μ L, MgCl₂(25 mM) 10 μ L, dNTP Mixture (10 mM) 5 μ L, RNase Inhibitor (40 U/ μ L) 1 μ L, AMV RTase XL (5 U/ μ L) 1 μ L, AMV-Optimized Taq (5 U/ μ L) 1 μ L, 上游特异性引物 (20 μ M)1 μ L, 下游特异性引物 (20 μ M) 1 μ L, 样品 RNA (\leq 1 μ g total RNA) 1 μ L, RNase-Free dH₂O 24 μ L。(2) RT-PCR 反应: RT 反应, 50 $^{\circ}$ C, 40min; RTase 失活, 95 $^{\circ}$ C, 3min; PCR 反应, 95 $^{\circ}$ C 30s, 57 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 1min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10min, 4 $^{\circ}$ C 保温。

3.1.1.10.5 电泳

扩增产物和 DNA Marker 各 5 μ L, 上样缓冲液 1 μ L, 1.5%琼脂糖凝胶电泳; 将凝胶在 0.5 μ g/mL EB 中染色约 8min, 凝胶成像分析。

3.1.1.10.6 条带光密度分析

用 Quantity One v4.52 软件进行条带光密度值分析。

3.1.1.10.7 基因表达量的测定

采用内标法, 即基因表达量用目的基因光密度与内标基因光密度比值表示 (见公式 3-2)。

$$\text{基因表达量} = \frac{\text{目的基因 OD 值}}{\text{内标基因 OD 值}} \quad \text{公式 3-2}$$

3.1.1.11 数据分析

用 SPSS 11.0 进行均数间 (MEAN \pm SD) 差异显著性比较

3.1.2 结果

3.1.2.1 喹胺醇对 CYP 1A1 mRNA 表达影响

由表 3-3 可见, 200mg/kg 以下剂量处理组大鼠肝微粒体 CYP1A1 的 mRNA 表达水平与对照组 (C) 间无明显差别, 400mg.kg 剂量组 CYP1A1 mRNA 却显著低于对照组 (P<0.05); 药物处理组 II、III、IV 组间该基因 mRNA 表达水平亦无明显差异, 但最高剂量组 (I) mRNA 水平则略低于其它三个药物剂量组。200mg.kg 以下剂量组间无任何明显差别 (见图 3-1)。

表 3-3 鼠肝 CYP1A1 mRNA 表达水平

Table3-3 CYP 1A1 mRNA expression of liver in rats			
组别 Group	样本数 Number	药物剂量 (mg/kg. 体重) Drug dose (mg/kg.BW)	OD _{CYP1A1} /OD _{β-actin}
I	6	400	0.8647 \pm 0.1612*
II	6	200	0.9009 \pm 0.1305
III	6	100	0.8948 \pm 0.0782
IV	6	50	0.8919 \pm 0.1430
C	6	0.9% NaCl	0.9055 \pm 0.0972

注: *药物处理与对照组 P<0.05, **与对照组 P<0.01 下表同

Note: * represent treated groups compared with Control group P<0.05, ** represent treated groups compared with Control group P<0.01. Following tables are same

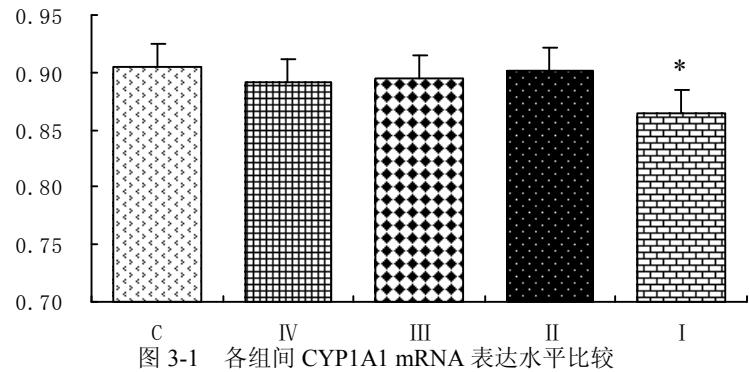


图 3-1 各组间 CYP1A1 mRNA 表达水平比较
Fig.3-1 Comparison of CYP1A1 mRNA expression between group C and drug treated groups

3.1.2.2 喹胺醇对 CYP 2E1 mRNA 表达影响

表 3-4 鼠肝 CYP2E1 mRNA 表达水平

Table3-4 CYP 2E1 mRNA expression of liver in rats

组别 Group	样本数 Number	药物剂量 (mg/kg. 体重) Drug dose (mg/kg.BW)	OD _{CYP2E1} /OD _{β-actin}
I	6	400	0.9969±0.1374**
II	6	200	1.0152±0.0970**
III	6	100	1.0543±0.1511
IV	6	50	1.0365±0.1867
C	6	0.9% NaCl	1.1176±0.1025

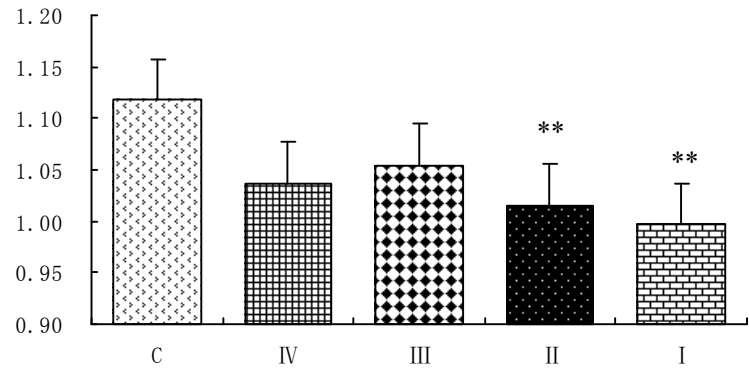


图 3-2 各组间 CYP 2E1 mRNA 表达水平比较
Fig.3-2 Comparison of CYP 2E1 mRNA expression between group C and drug treated groups

由表 3-4 可见，药物处理组大鼠肝 CYP2E1 mRNA 表达水平均低于对照组，而 200mg/kg 以上剂量组与对照组间的差异呈极显著性 ($P<0.01$)。药物处理组间，50、100mg/kg 二个剂量组该

基因 mRNA 表达水平高于 200mg/kg、400mg/kg 剂量组，但无明显统计学意义（见图 3-2）。

3.1.2.3 喹胺醇对 CYP 3A1 mRNA 表达影响

由表 3-5 可见，药物处理组大鼠肝 CYP3A1 mRNA 表达水平亦均低于对照组（C），200mg/kg 以上剂量组与对照组间差异极显著（ $P<0.01$ ）。药物处理组间，200、400mg/kg 剂量组该基因 mRNA 表达水平显著低于 100mg/kg 剂量组（ $P<0.05$ ）（见图 3-3）。

表 3-5 鼠肝 CYP3A1 mRNA 表达水平

Table3-5 CYP 3A1 mRNA expression of liver in rats

组别 Group	样本数 Number	药物剂量 (mg/kg.体重) Drug dose (mg/kg.BW)	OD _{CYP3A1} /OD _{β-actin}
I	6	400	0.9243±0.1205**
II	6	200	0.9571±0.1038**
III	6	100	1.0629±0.0861
IV	6	50	1.0177±0.0820
C	6	0.9% NaCl	1.0931±0.1105

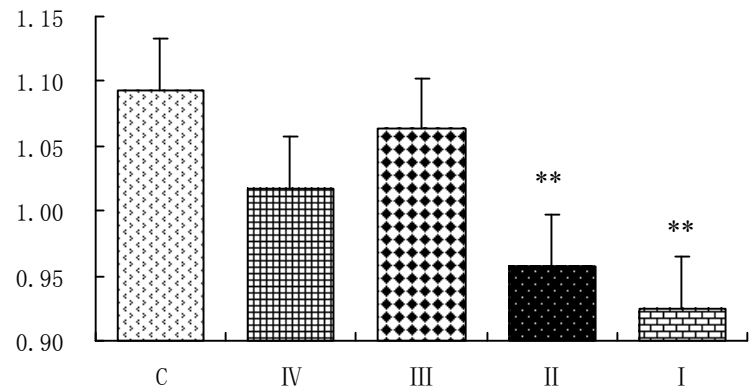
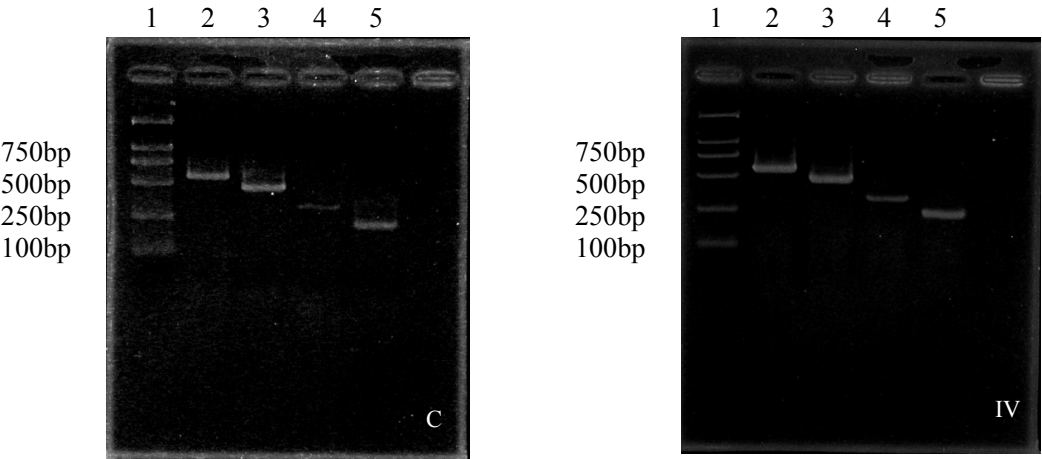


图 3-3 各组间 CYP 3A1 mRNA 表达水平比较

Fig.3-3 Comparison of CYP 3A1 mRNA expression between group C and drug treated groups

3.1.2.4 CYP 三个亚型基因 PCR 扩增图



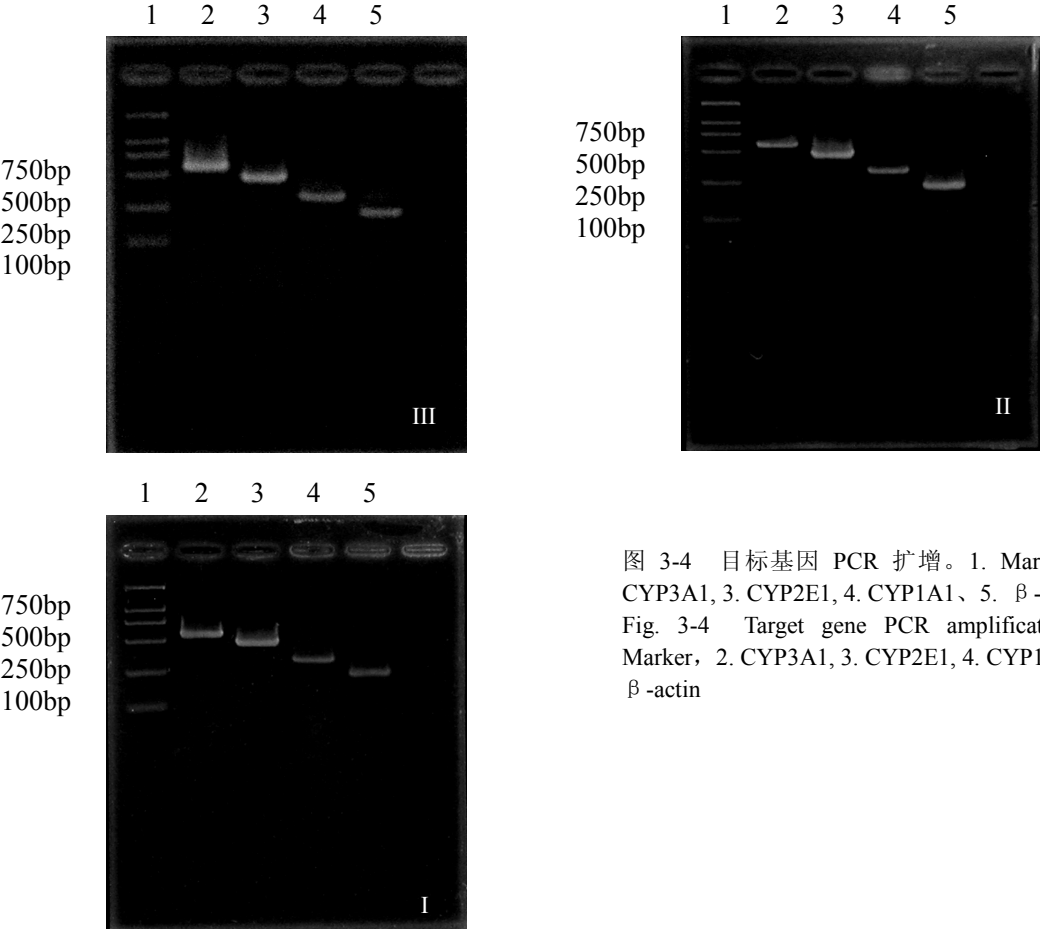


图 3-4 目标基因 PCR 扩增。1. Marker, 2. CYP3A1, 3. CYP2E1, 4. CYP1A1、5. β -actin
Fig. 3-4 Target gene PCR amplification. 1. Marker, 2. CYP3A1, 3. CYP2E1, 4. CYP1A1、5. β -actin

由 RT-PCR 扩增图可见，无论是药物处理组还是空白对照组，目标基因 CYP3A1, CYP2E1、CYP1A1 和 β -actin 均有表达。

3.1.2.4 喹胺醇对 CYP 基因亚型 mRNA 表达水平与给药剂量间的相关性分析

表 3-6 鼠肝 CYP 基因亚型 mRNA 表达水平与给药剂量间的相关性
Table3-6 Correlation between expression of CYP 3A1 mRNA and drug dose

基因	相关方程	相关系数平方 (R^2)	P 值
Gene	Correlation equation	R square (R^2)	P Value
CYP1A1	$y = -8E-05x + 0.9035$	0.6329	0.204
CYP2E1	$y = -0.0001x + 1.0463$	0.6305	0.118
CYP3A1	$y = -0.0003x + 1.0546$	0.7311	0.145

由图 3-1、2、3 可见，不同给药剂量组目标基因表达水平的变化高低变化趋势不尽相同，但总体趋势基本一致，即随给药剂量的增加，基因表达量呈下降趋势。给药剂量与三个 CYP450 亚基因的 mRNA 水平间均呈负相关性（表 3-6），但无显著性统计学意义。

3.1.3 讨论

3.1.3.1 喹胺醇对 CYP1A1 mRNA 表达水平的影响

CYP1A1属CYP1A基因家族成员,是目前研究最多、最为深入的CYP亚型之一。不同物种CYP1A1基因组成差异较大,大鼠CYP1A1 mRNA全长约2615bp (Genbank, NM_012540.2, GI:46048640)。CYP1A1基因组中,有一段高度同源序列,位于700-1100bp之间,常被做为目标基因扩增片段,检测该基因的mRNA表达量。一般认为,外源性物质进入机体后,如果CYP1A1 mRNA表达量增加,就可以认为该物质可能对CYP1A1有诱导作用,或CYP1A1参与了该物质在机体内的代谢;如果CYP1A1 mRNA表达量下调,则认为该物质可能对CYP1A1有抑制作用;如果对CYP1A1 mRNA的表达没有明显影响,就可以认为该物质对CYP1A1在转录水平上无影响(庞莉萍, 2005)。广泛流行病学调查研究发现,CYP1A1在许多癌症(如肺癌、胃癌、乳腺癌等)发病学中有一定作用,因此其被认为是一种外源性化合物致癌作用的潜在性指标(Masson LF, 2005)。CYP1A1在外源性化合物、外源性致癌物或前致癌物的活化过程中起重要作用,催化这些物质发生氧化反应,并将其转化成活性较高的亲电子化合物(electrophile),这类化合物可与蛋白质、DNA、RNA等发生亲合反应,并形成加合物(adducts),从而损伤这些大分子物质,导致细胞发生异常变化,甚至诱发肿瘤或癌症(Kisselev P, 2005)。如当环境毒物多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbon, PAHs)、多氯代二苯并二噁英(Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, PCDDs)、TCDD、多氯联苯(polychlorinated biphenyls, PBs)、黄曲霉素B1(aflatoxin B1)等进入机体或加入细胞培养介质中,在CYP1A1的催化作用下发生环化反应,形成环氧化物(epoxide),并可能攻击大分子物质如蛋白质、核酸等而致毒(Adam T, 1998)。因此,研究药物对机体CYP1A1的影响,对药物或毒物的安全性评价有重要意义。

喹胺醇是新型兽用抗菌促生长药物,其母体结构为喹啉啉不同侧链衍生物,喹啉啉也是一种杂环芳烃类物质。前期研究结果虽表明,喹胺醇毒性作用小于同类产品卡巴氧、喹乙醇等。但报道象同类产品喹乙醇、卡巴氧等在体外培养细胞中可能有弱的致突变作用。这类药物是否与CYP1A1有关,CYP1A1是否参与了该类药物的代谢,尚未见报道。本实验给Wistar大鼠分别连续7d口服剂量50、100、200、400mg/kg体重的喹胺醇后,结果200mg/kg以下药物剂量组鼠肝微粒体中CYP1A1 mRNA的表达量与对照组(给生理盐水7d)无明显差别,但400mg/kg剂量组则显著低于对照组($P<0.05$) (见表3-3); 药物处理组之间,连续口服400mg/kg喹胺醇的大鼠肝微粒体CYP1A1 mRNA的表达量却低于200mg/kg以下三个剂量组,并具有显著性统计学意义($P<0.05$); 药物剂量与CYP1A1 mRNA水平间呈负相关性,但不显著。这些结果提示,当给药剂量低于200mg/kg体重时,喹胺醇不会对大鼠肝微粒体CYP1A1在mRNA水平上产生明显影响;但当给药剂量大于400mg/kg体重时,喹胺醇可能对大鼠肝微粒体CYP1A1 mRNA的基因表达产生抑制作用。文献报道(刘兆颖, 2006),当给动物饲喂同类药物喹乙醇后,通过HPLC法检测发现,肝组织中CYP1A1可能没有参与喹乙醇的I相代谢反应,因为肝组织中CYP1A1的活性变化不明显。结合本实验推测,CYP1A1可能未参与低剂量喹胺醇或喹乙醇的体内代谢;也可能与肝内CYP1A1水平低有关,因为该酶大量存在于肝外其它组织细胞中(Yoshaki. FJ, 1992)。因此推测,喹胺醇可能不会因CYP1A1在转录水平上的过表达,从而对机体产生某种毒性作用,这还需大量研究数据证明。但文献报道中,喹啉啉不同侧链衍生物则具有诱导CYP1A1基因表达的作用,不过作用相对较弱。Hummerich J (2004)报道,食物源性杂环芳胺会引起肝细胞CYP1A1基因表达量的增加,当细胞培养液中2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx)的量达到0.001M时,其对杂环芳胺诱导CYP1A1基因表达有协同作用。在MeIQx影响CYP1A1的研究中,也有持不同观点者。Joseph PD (2001)通过重组人CYP450在大肠杆菌E. coli lacZ中表达发现,MeIQx对

CYP1A1的影响很微弱。Sadrieh N (1995) 研究发现, 喹噁啉类药物2-amino-3,8-dimethylimidazo [4,5-f]quinoxaline 和 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline(IQ) 在猴子体内, 对 CYP1A1 和 CYP1A2的诱导作用也很微弱。由此推测, 喹噁啉类药物对机体肝微粒体CYP1A1的诱导作用也可能很微弱。

CYP1A1的诱导机制与芳香烃受体(aryl hydrocarbon receptor, AhR)有关, 它是一个配体活化的转录因子, 与许多杂环芳烃(PAH)的生物反应调节有关, CYP1A1可催化多环芳烃化合物生成活性代谢产物(冷欣夫, 2001; Morioka, 2006)。主要是因为该酶基因的5'端有外源化合物反应元件(xenobiotic responsive elements, XREs), 该元件通常与HSP90、AhR相关蛋白(AhR interaction protein, AIP)结合。当有外源性配体如TCDD、三甲基胆蒎(3-MC)等进入机体或加入细胞培养液中后, 会迅速靠近AhR并与之结合, 导致构象改变, 结果HSP90等结合蛋白脱离, AhR核转移因子(Ah receptor nuclear translocator, ARNT)与其又结合形成异二聚体, 之后进入细胞核, 并与P450A1基因的XRE结合, 从而增强基因的转录活性(Meredith C, 2003)。有些药物如7, 8-苯黄酮、三羟黄酮等对CYP1A1会产生抑制作用(夏世钧, 2001), 但对该酶的抑制机理尚不清楚, 其中有些抑制是可逆的、有些是不可逆的。本实验中, 高剂量的喹胺醇对CYP1A1在mRNA水平上可产生抑制效果, 其原理是否与CYP1A1的传统抑制剂相同, 是否会产生病理反应, 这有待深入研究。另据报道, 有一种转录因子SP1, 其中含有三个高度同源的C端锌指结构基元(zinc—finger motifs)可能与CYP1A1基因表达抑制有关。因此, 临床上喹胺醇可以与一些具有诱导CYP1A1的药物同时使用。

3.1.3.2 喹胺醇对 CYP2E1 mRNA 表达水平的影响

目前在人和大鼠 CYP2E 基因家族中, 只发现了 CYP2E1 一个家族成员。大鼠和人的 CYP2E1 非常相似(Wrighton, 1986), 所以常选用试验动物大鼠推测 CYP2E1 在人类疾病和相关药物代谢中的作用。虽然, CYP2E1 最初发现于肝组织, 肝小叶区含量最高, 其次是枯否氏细胞, 但肝外组织含量也较高, 如肾、脑、肠等组织中均有各自的 CYP2E1 (Ingelman-Sundberg M, 1988, Neve EP, 1999)。CYP2E1 和其它大多数 CYP450 一样, 也依靠疏水氨基端附着在内质网膜上, 催化中心位于羧基端并游离于细胞浆中。CYP2E1 从内质网中转运到高尔基器, 装配后可附着于质膜上, 这些 CYP2E1 可能与一些自身免疫病所致的肝细胞毒性有关(Neve EP, 2001)。线粒体 CYP2E1 磷酸化在药物代谢过程中起重要作用, 磷酸化可被吡唑诱导(Robin MA, 2001)。CYP2E1 的生物学意义在毒理学和毒物代谢方面。CYP2E1 参与了许多毒性物质或药物的动员和活化, 如乙醇、四氯化碳、对乙酰氨基酚、一些潜在性致癌物如亚硝胺等, 这些物质被动员或活化后, 发生代谢转化, 毒性会更强。体内、外试验研究发现, CYP2E1 诱导物具有协同作用, 会导致毒性作用增大; 如果有 CYP2E1 抑制剂存在时, 诱导物的毒性作用会减弱。CYP2E1 除其在毒理学方面的意义外, 还可在某些病理过程中发挥积极作用, 如马洛里小体(mallory body, MB)是慢性肝病的一种病理变化, CYP2E1 水平升高后会降低 MB 的发生率, 并有利于肝病好转(Bardag-Gorce F, 2005), 这可能与该酶能促进毒物代谢有关(Girre C, 1994)。

CYP2E1 底物及其诱导报道较多, 但对其抑制相关研究较少。CYP2E1 的底物有多种, 多为小分子化合物, 内源性底物以丙酮为主, 在该酶的作用下丙酮会转变成乙酰甲醇或甲基乙二醛(Koop DR, 1985), 外源性底物多为一些分子量较小的疏水性化学物质, 如氯仿、四氯化碳、芳香烃(如苯、甲苯)、醇(如乙醇、戊醇)、醛(如乙醛)、卤化麻醉剂(如氨氟醚、三氟溴氯乙烷)、亚硝胺(二甲基亚硝胺)、药物(如氯唑沙宗(chlorzoxazone)、对乙酰氨基酚)等(Lieber

CS, 1999)。CYP2E1 的诱导因素是多方面的, 可以归纳为以下几点: (1) 药物性诱导, 如上述底物作用后, CYP2E1 的表达会上调; (2) 营养因素, 如饲料中脂肪含量过高碳水化合物含量底时, CYP2E1 的水平也会升高; (3) 病理性作用, 如糖尿病 (Woodcroft KJ, 2002); (4) 生理紊乱性作用, 如垂体切除、三碘甲状腺氨酸过高时, CYP2E1 mRNA 水平也会升高 (Hong JY, 1990)。目前, 已公认的 CYP2E1 抑制剂为二硫化四乙基秋蓝姆 (夏世钧, 2001); 另外有报道, 培养的乳鼠肝细胞中胰高血糖素 (glucagon) 会降低 CYP2E1 的水平 (Eliasson E, 1992)。

本实验结果显示, 当给大鼠连续口服 50、100、200、400mg/kg 体重的喹胺醇后, 与对照组相比 50、100mg/kg 体重剂量组的大鼠肝细胞 CYP2E1 mRNA 没有明显变化; 但 200、400mg/kg 体重则极显著低于对照组 ($P < 0.01$), 同时也低于 100mg/kg 体重以下低剂量药物处理组, 但无明显统计学意义 (见表 3-4、图 3-2); 相关性分析结果 (见表 3-6) 是, 给药剂量与 CYP2E1 mRNA 水平间呈负相关性。上述结果表明, 给试验动物大鼠饲喂剂量小于 100mg/kg 体重的喹胺醇后, 不会对肝细胞 CYP2E1 在 mRNA 水平上产生明显影响; 但当喹胺醇剂量大于 200mg/kg 体重后, 可能会抑制大鼠肝细胞 CYP2E1 的 mRNA 表达, 且这种抑制作用与药物剂量间有剂-效关系。因此, 可以推测喹胺醇不会因为 CYP2E1 而有潜在致癌的毒性作用, 这还需要大量的研究数据证实; 喹胺醇抑制 CYP2E1 mRNA 的表达的可能性机理亦有待深入研究, 推测可能与喹胺醇在体内代谢成某种能抑制 CYP2E1 的物质或其本身就有抑制作用有关。喹胺醇在体内的代谢产物尚不清楚, 但同类药物如喹烯酮、喹赛多等的代谢研究结果是, 这类物质可能会在机体内转化为喹噁啉-2-羧酸, 但具体代谢转化仍在研究中。是否这种代谢物会对 CYP2E1 产生本实验结果中同样的影响呢? 还不得而知, 有待研究。据报道, CYP2E1 的抑制多在转录后水平, 所以一般不会表现在 mRNA 水平 (Morishima Y, 2005)。

3.1.3.3 喹胺醇对 CYP3A1 mRNA 表达水平的影响

CYP3A 是 CYP3 家族成员之一类, CYP3A1 属 3A 亚族。大鼠 CYP3A1 基因组约有 1700bp (Gen bank: M86850.1 GI:205919), 该类酶在许多临床药理、毒理学和药物代谢方面具有重要意义, 参与药物的首过效应和药物相互作用 (Ma Y, 2004)。目前, 已被鉴定的大鼠 CYP3A 基因有: CYP3A1 (Gonzalez FJ, 1983), CYP3A2 (Gonzalez, 1986), CYP3A9 (Mahnke, 1997), CYP3A18 (Nagata, 1996), CYP3A23 (Noreault-Conti TL, 2006), and CYP3A62 (Matsubara, 2004)。大鼠 CYP3A1 和 CYP3A2 的基因组有 90% 的同源性、而辅基蛋白也有 89% 的同源性 (Gonzalez, 1986)。

本试验结果显示 (见表 3-5), 当给试验大鼠连续口服不同剂量的喹胺醇后, 大鼠肝微粒体 CYP3A1 的 mRNA 水平均低于对照组 (C), 而 200mg/kg 体重和 400mg/kg 体重剂量组小鼠肝组织该酶 CYP3A1 mRNA 与对照组间呈极显著性统计学意义 ($P < 0.01$)。药物处理组之间, 最高剂量组 (即 400mg/kg 体重) CYP3A1 基因 mRNA 表达水平显著低于 50、100mg/kg 体重组 ($P < 0.05$); 200mg/kg 体重组略低于低于 100mg/kg 体重以下剂量组, 但无明显统计学意义 (见图 3-3); 另外, 根据相关性分析结果, 给药剂量与 CYP3A1 mRNA 表达水平间呈负相关性等。我们可以推测, 喹胺醇可能对大鼠 CYP3A1 的转录水平上有某种抑制作用, 随给药剂量的增加这种影响抑制作用会增强。

CYP3A1 既能被多种化合物所诱导, 也能被某些化合物所抑制。如大鼠体内或培养细胞中 16 α -孕烯 (甾) 酮醇 (pregnenolone-16 α -carbonitrile, PCN) 过量时, 大鼠肝脏 CYP3A1 mRNA 会大量表达, 表明 PCN 可诱导 CYP3A1 (Meredith. C, et al, 2003), 该物质是 CYP3A1 的代表性诱导

剂。抗癌药物紫杉醇、多西塔塞、紫杉烷等也可诱导大鼠、人等肝细胞或体外培养细胞中 CYP3A1、CYP3A2 的大量表达 (Gut I, 2006), 这有助于药物的抗癌作用。奥美沙星进入机体后, 其主要 I 相代谢酶就是 CYP3A1, 该药也会诱导 CYP3A1 的表达 (Lee DY, 2006)。利福霉素是临床上常用的抗结核药, 也能诱导人或鼠的 CYP3A1 mRNA 的表达 (Morioka Y, 2006)。对 CYP3A1 抑制作用药物近年来也报道了很多。环孢素 A (cyclosporin A, CsA) 和盐酸小檗碱 (berberine chloride, Ber) 在人器官移植后可以作为免疫抑制药物和治疗腹泻的药物, 试验发现当这两种药物同时使用后, 会导致小鼠肝细胞中 CYP3A1 mRNA 水平的下降, 表明药物对该酶有抑制作用, 这种作用可以延长药物在体内作用时间, 有利于药效的最大程度发挥 (辛华雯, 2004)。酮康唑是临床上用于抗真菌的药物, 它对小鼠 CYP3A1 mRNA 的表达也有抑制作用 (余爱华, 2004)。据报道随年龄的增加, 试验动物肝细胞 CYP3A1 mRNA 也会逐渐下降, 说明衰老对该酶也有抑制效果或促进降解的作用 (Day KC, 2006)。虽然对 CYP3A1 的诱导物或抑制剂作了大量研究工作, 但目前对 CYP3A1 的诱导和抑制机制尚不清楚。结合本实验结果和文献报道, 喹胺醇在机体内的代谢与 CYP3A1 有一定关系, 但只有在高剂量时才能诱导该酶水平下降, 这是否也有利于药物在体内作用时间的延长, 有利于提高药物的生物利用率, 是否会产生某些病理或毒理影响, 还不得而知, 不过本试验各给药剂量下的试验鼠均未见任何异常变化, 具体还需深入研究。

3.2 喹胺醇对大鼠肝细胞色素 P450 同工酶活性影响

3.2.1 材料与方法

3.2.1.1 主要试剂

EDTA (BBI, 0919s05), Tris (AMRESCO, 3044B19), NADPH-Na₄ (ROCHE, 621706), Resorufin (SIGMA, 11128CE), Ethoxyresorufin (SIGMA, 036k4098), 红霉素 (BBI, 1217S05), 氨基比林 (上海生工, 0201S05), 保险粉 (上海生工, 1026S04), Na₂S₂O₄ (上海生工, 1026s04), 其余试剂均为国产分析纯级。

3.2.1.2 主要仪器

Super 22K 型高速离心机 (韩国), Beckman J6-HC 型低速大容量离心机 (美国), METTLER TOLEDO AX205 电子分析天平 (瑞士), METTLER TOLEDO AL204 电子分析天平 (瑞士), GBC Cintra 6 型紫外-可见双光束分光光度计 (澳大利亚), SHIMADZU RF-5301PC 型荧光分光光度计 (日本)。

3.2.1.3 试验动物和饲料

Wistar 大鼠 60 只, 体重 180±30g, 雌雄各半, 购自兰州军区陆军总医院实验动物中心, 随机分为 5 组, 每组 12 只。分别为高剂量组 (I)、较高剂量组 (II)、中剂量组 (III)、低剂量组 (IV) 和生理盐水对照组 (Control), 雌雄分开饲养。试验饲料亦购自兰州军区陆军总医院实验动物中心, 为小鼠专用颗粒饲料, 未添加任何其它药物。动物自由饮水、自由采食。

3.2.1.4 试验药物

喹胺醇原料药, 由中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所新兽药工程实验室提供, 经本实验室纯结晶纯化后, 纯度为 99.97%。

3.2.1.5 给药剂量

将喹胺醇用 2% 的吐温-80 助溶, 再用蒸馏水配制成不同浓度的混悬液, 见表 3-7, 对照组用

0.9% NaCl 溶液代替药物。

表 3-7 药物浓度和给药剂量
Table 3-7 Drug concentration and dose

组别 Group	给药剂量 (mg/kg.体重) Drug dose (mg/kg.BW)	饲料添加量 (mg/kg.饲料) Additive dose (mg/kg.diet)	浓度 (mg/mL) Concentration(mg/mL)
I	400	2880	60
II	200	1440	30
III	100	720	15
IV	50	360	7.5

3.1.1.6 给药方法

按每天 25g 体重 0.1mL 药液，分别给不同组大鼠灌胃相应剂量的喹胺醇混悬液，连续 7d。每天称量试验鼠体重，以确定给药量。

3.1.1.7 研究内容

- (1) 喹胺醇对肝微粒体 CYP450 含量的影响
- (2) 喹胺醇对肝微粒体氨基比林 N-脱甲基酶(APND)活性的影响
- (3) 喹胺醇对肝微粒体红霉素 N-脱甲基酶(EMND)活性的影响
- (4) 喹胺醇对肝微粒体 7-乙氧基香豆素脱乙基酶(EROD)活性的影响
- (5) 喹胺醇对肝微粒体细胞色素 b5 的影响
- (6) 喹胺醇对肝微粒体谷胱甘肽转硫酶 (GST) 的影响

3.1.1.8 微粒体制备

大鼠最后一次给药后，禁食 12h，断头处死，尽量放血，分离肝脏，采用钙沉淀法制备肝微粒体（徐淑云，2001）。制作肝组织匀浆；4℃，12 500g，离心 25min，取上清加 88mmol/L CaCl₂ 溶液混匀，冰浴 5min；4℃，27 000g 离心 15min；洗涤沉淀 1 次，微粒体以 0.1mol/L 磷酸缓冲液（含 20%甘油）重悬，-40℃保存备用。

3.1.1.9 酶活性检测

微粒体蛋白含量测定采用考马斯亮兰蛋白测定试剂盒；肝 CYP450 含量测定采用 CO 还原差示光谱法（徐淑云，2001）；细胞色素 b5 参照徐淑云药理学实验方法学；氨基比林 N-脱甲基酶 (Aminopyrine N-Demethylase, APND)、红霉素 N-脱乙基酶(Erythromycin N-Demethylase, EMND) 活性测定方法参见文献（Nash T, 1953），稍加改进，氨基比林和红霉素终浓度分别为 24mg/mL 和 4mmol/L，反应时间 30min，代谢产物甲醛用 Nash 试剂定量；7-乙氧基香豆素脱乙基酶 (7-Ethoxyresorufin O-Deethylase, EROD)活性测定方法参见文献(Huggett RJ, 2006; Peng TZ, 2004)，7-乙氧基香豆素终浓度为 1mmol/L，反应时间 10min，荧光条件为激发波长 530nm，发射波长 586nm；谷胱甘肽硫转酶活性检测，采用南京建成试剂盒法。

3.1.1.10 数据处理

用 SPSS 11.0 统计各组间均数（MEAN±SD）差异显著性 T-检验。

3.2.1 结果

3.2.1.1 喹胺醇对 CYP450 含量影响

表 3-8 鼠肝 CYP450 含量
Table 3-8 CYP450 Content of liver in rats

组别	样本数	药物剂量 (mg/kg.体重)Drug	雄 CYP450 含量(nmol·mg ⁻¹)	雌 CYP450 含量(nmol·mg ⁻¹)
Group	Number	dose (mg/kg. BW)	Male CYP 450 content(nmol·mg ⁻¹)	Female CYP 450 content(nmol·mg ⁻¹)
I	6	400	0.4134±0.0429*	0.4473±0.1144
II	6	200	0.4528±0.0906*	0.4654±0.1041
III	6	100	0.4919±0.0839*	0.4807±0.1108*
IV	6	50	0.5408±0.0808	0.5601±0.2577*
C	6	0.9% NaCl	0.5806±0.0929	0.4032±0.0603

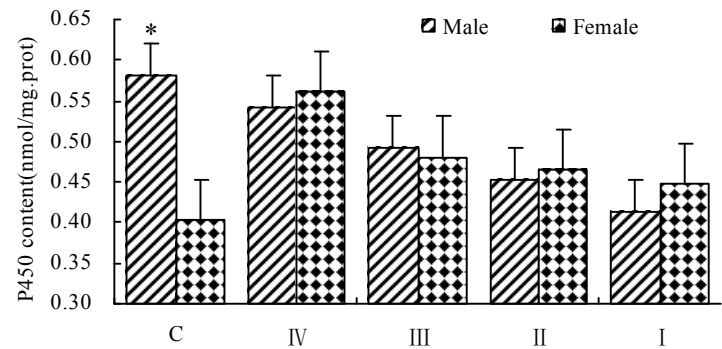


图 3-5 CYP 450 含量雌雄鼠间比较
Fig.3-5 Difference of CYP 450 content between male and female rats

由表 3-8 可见，给雄性大鼠连续口服喹胺醇 7d 后，肝微粒体 CYP450 含量均低于对照组 (C)；除低剂量组 (IV) 外，其它三个剂量组该酶含量与对照组间存在显著性差异 ($P<0.05$)；药物处理组之间，高剂量组 (I) CYP450 含量显著低于低剂量组 (IV) ($P<0.05$)。

雌鼠连续用药 7d 后，药物处理组肝微粒体 CYP450 含量均高于对照组，低剂量组 (IV) 和中剂量组 (III) 与对照组间的差异有显著性统计学意义 ($P<0.05$)；药物处理组间鼠肝微粒体 CYP450 含量低剂量组 (IV) 略高于其它三组，但差异不显著。

由表 3-8 和图 3-5 可见，对照组中雄鼠的肝微粒体 CYP450 含量极显著高于雌鼠 ($P<0.01$)，但连续服用喹胺醇 7d 后，这种性别间的差异则变得不明显。该结果提示喹胺醇对雌鼠的 CYP450 影响作用更为显著。

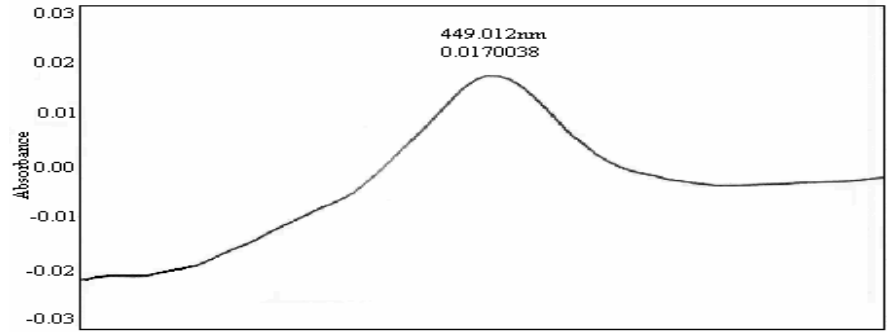


图 3-6 CYP450 光谱扫描曲线
Fig. 3-6 CYP450 spectrometer scanning file

由图 3-6 可见, CYP450 在可见光范围内的扫描曲线吸收峰均在波长 $450\pm 2\text{nm}$ 处, 且比较稳定。

3.2.1.2 喹胺醇对 APND 活性影响

由表 3-9 可见, 给雄性大鼠连续口服喹胺醇 7d 后, 低剂量组 (IV) 肝微粒体 APND 活性高于对照组 (C), 但无统计学意义; 其它三个药物处理组该酶活性却极显著低于对照组 (C) ($P<0.01$); 药物处理组间, 低剂量组鼠肝 APND 活性极显著高于其它三组 ($P<0.01$), 而 I、II、III 三组间鼠肝 APND 活性则无明显差异。

雌鼠连续用药 7d 后, 药物处理组肝微粒体 APND 活性均低于对照组 (C), 中剂量组 (III) 显著 ($P<0.05$)、高剂量组 (I) 和较高剂量 (II) 极显著 ($P<0.01$) 低于对照组; 药物处理组间鼠肝微粒体 APND 活性, 二个高剂量组明显低于二个低剂量组 ($P<0.05$)。

由上表 3-9 和图 3-7 可见, 各组雄鼠的微粒体 APND 活性极显著高于雌鼠 ($P<0.01$), 连续口服喹胺醇 7d 后, 对这种性别差异无明显影响。

表 3-9 鼠肝 APND 活性

Table 3-9 APND activity of liver in rats

组别	样本数	药物剂量(mg/kg.体重)	雄 APND 活性(nmol/min·mg)	雌 APND 活性(nmol/min·mg)
Group	Number	Drug dose(mg/kg.BW)	Male APND activity(nmol/min·mg)	Female APND activity(nmol/min·mg)
I	6	400	$0.8128\pm 0.0572^{**}$	$0.3849\pm 0.0279^{**}$
II	6	200	$0.8414\pm 0.0852^{**}$	$0.4505\pm 0.0269^{**}$
III	6	100	$0.9136\pm 0.1715^{**}$	$0.5318\pm 0.0960^{*}$
IV	6	50	1.1699 ± 0.0521	0.5503 ± 0.0831
C	6	0.9% NaCl	1.0355 ± 0.1508	0.5954 ± 0.0420

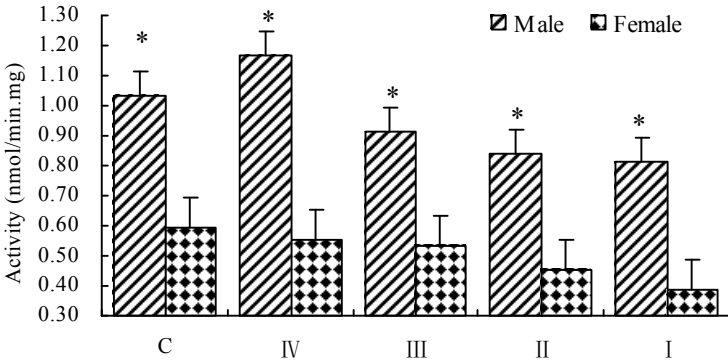


图 3-7 APND 活性雌雄鼠间比较

Fig.3-7 Difference of APND activity between male and female rats

3.2.1.3 喹胺醇对 EMND 活性影响

表 3-10 鼠肝 EMND 活性

Table 3-10 EMND activity of liver in rats

组别	样本数	药物剂量(mg/kg.体重)	雄 EMND 活性(nmol/min·mg)	雌 EMND 活性(nmol/min·mg)
Group	Number	Drug dose(mg/kg.BW)	Male EMND activity(nmol/min·mg)	Female EMND activity(nmol/min·mg)
I	6	400	$0.1325\pm 0.0176^{**}$	$0.1056\pm 0.0099^{**}$
II	6	200	$0.1533\pm 0.0126^{**}$	$0.1026\pm 0.0069^{**}$
III	6	100	0.1628 ± 0.0170	0.1338 ± 0.0230
IV	6	50	0.1834 ± 0.0110	0.1324 ± 0.0341
C	6	0.9% NaCl	0.1691 ± 0.0148	0.1267 ± 0.0229

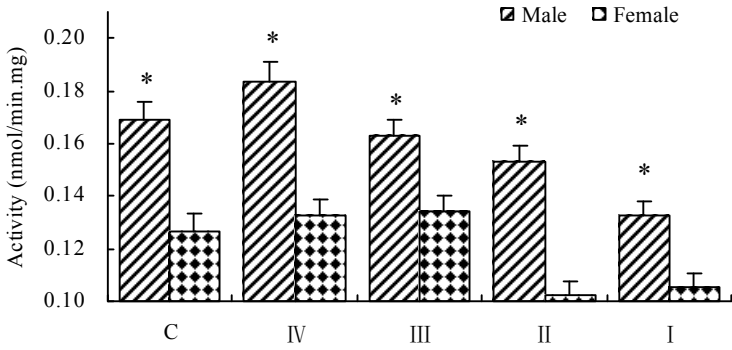


图 3-8 EMND 活性雌雄鼠间比较

Fig.3-8 Difference of EMND activity between male and female rats

由表 3-10 可见，给雄性大鼠连续口服喹胺醇 7d 后，低剂量组（IV）肝微粒体 EMND 活性高于对照组（C），但无统计学意义；另外三个药物处理组该酶活性均低于对照组，但只有较高剂量组（II）和高剂量组（I）与对照组间存在极显著性差异（ $P<0.01$ ）；药物处理组之间，低剂量组（IV）鼠肝 EMND 活性极显著高于其它三组（ $P<0.01$ ），中剂量组（III）亦极显著高于高剂量组（ $P<0.01$ ）。

雌鼠连续用药 7d 后，低剂量组（IV）和中剂量组（III）肝微粒体 EMND 活性则高于对照组（C），但无明显统计学意义；较高剂量组（II）和高剂量组（I）鼠肝 EMND 活性极显著低于对照组（ $P<0.01$ ）；药物处理组间鼠肝微粒体 EMND 活性，二个高剂量组低于二个低剂量组。

由上表 3-10 和图 3-8 可见，各组雄鼠的微粒体 EMND 活性亦极显著高于雌鼠（ $P<0.01$ ），给药后不会改变雌雄鼠间的 EMND 活性差异。

3.2.1.4 喹胺醇对 EROD 活性影响

表 3-11 鼠肝 EROD 活性

Table 3-11 EROD activity of liver in rats

组别	样本数	药物剂量(mg/kg.体重)	雄 EROD 活性(nmol/min·mg)	雌 EROD 活性(nmol/min·mg)
Group	Number	Drug dose(mg/kg.BW)	Male EROD activity(nmol/min·mg)	Female EROD activity(nmol/min·mg)
I	6	400	47.20±11.82**	61.79±10.94**
II	6	200	50.20±13.47**	65.18±14.07**
III	6	100	67.50±16.54**	64.39±22.32**
IV	6	50	70.73±22.41**	70.47±26.21**
C	6	0.9% NaCl	24.74±3.18	20.66±2.12

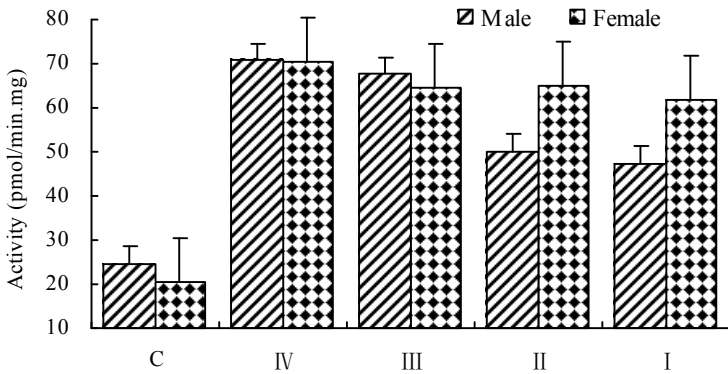


图 3-9 EROD 活性雌雄鼠间比较

Fig.3-9 Difference of EROD activity between male and female rats

由表 3-11 可见, 给雄性大鼠连续口服喹胺醇 7d 后, 药物处理组鼠肝微粒体 EROD 活性均极显著高于对照组 (C) ($P<0.01$); 药物处理组之间, 高剂量组 (I) 和较高剂量组 (II) 鼠肝微粒体 EROD 活性显著低于低剂量组 (IV) ($P<0.05$)。

雌鼠连续用药 7d 后, 药物处理组鼠肝微粒体 EROD 活性亦极显著高于对照组 ($P<0.01$); 药物处理组间鼠肝微粒体 EROD 活性, 低剂量组 (IV) 亦高于其它三个剂量组, 但只有高剂量组 (I) 与其有显著性差异 ($P<0.05$)。

由上表 3-11 和图 3-9 可见, 对照组雄鼠的微粒体 EROD 活性高于雌鼠, 但无显著差异; 药物处理组之间, 雌鼠在 200mg/kg 体重以上剂量组鼠微粒体 EROD 活性在连续口服喹胺醇 7d 后, 显著高于雄鼠 ($P<0.05$), 低剂量组与对照组雌雄差异变化规律一样。

3.2.1.5 喹胺醇对细胞色素 b5 活性影响

表 3-12 鼠肝细胞色素 b5 含量
Table 3-12 Cyt b5 content of liver in rats

组别	样本数	药物剂量(mg/kg.体重)	雄 Cyt b5 活性(nmol/ mg)	雌 Cyt b5 活性(nmol/ mg)
Group	Number	Drug dose(mg/kg.BW)	Male Cyt b5 activity(nmol/mg)	Female Cyt b5 activity(nmol/ mg)
I	6	400	0.2165±0.0198**	0.2529±0.0328
II	6	200	0.2143±0.0247**	0.2587±0.0547
III	6	100	0.2297±0.0812**	0.2040±0.0254
IV	6	50	0.2038±0.0410	0.1831±0.0769
C	6	0.9% NaCl	0.1646±0.0533	0.2301±0.0366

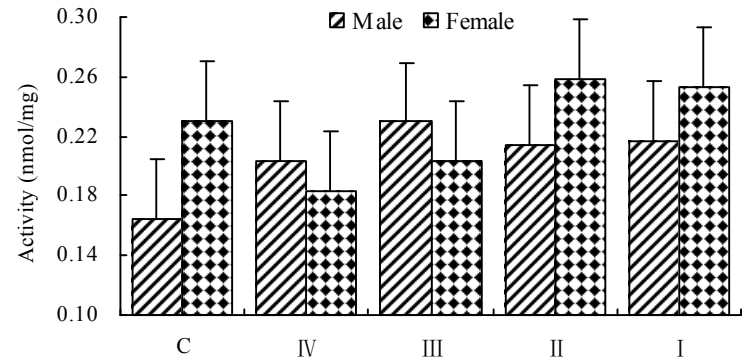


图 3-10 各组肝 Cyt b5 含量雌雄鼠间比较

Fig.3-10 Difference of Cyt b5 content between male and female rats

由表 3-12 可见, 给雄性大鼠连续口服喹胺醇 7d 后, 药物处理组鼠肝微粒体 Cyt b5 含量均高于对照组, 100mg/kg 以上剂量组与对照组间的差异极显著 ($P<0.01$); 药物处理组之间, 雄鼠肝 Cyt b5 含量无明显差别。

雌鼠连续用药 7d 后药物处理组鼠肝微粒体 Cyt b5 含量, 二个低剂量组低于对照组、二个高剂量组高于对照组, 但只有低剂量组 (IV) 与对照组有显著性统计学意义 ($P<0.05$); 药物处理组之间, 鼠肝微粒体 Cyt b5 含量, 二个低剂量组显著低于二个高剂量组 ($P<0.05$)。

由上表 3-12 和图 3-10 可见, 对照组雄鼠的肝微粒体 Cyt b5 含量明显低于雌鼠 ($P<0.05$); 药物处理组之间, 鼠肝微粒体 Cyt b5 含量在连续口服喹胺醇 7d 后, 各剂量对应组间除二个低剂量组外, 其它两个组亦是雌鼠明显高于雄鼠 ($P<0.05$)。

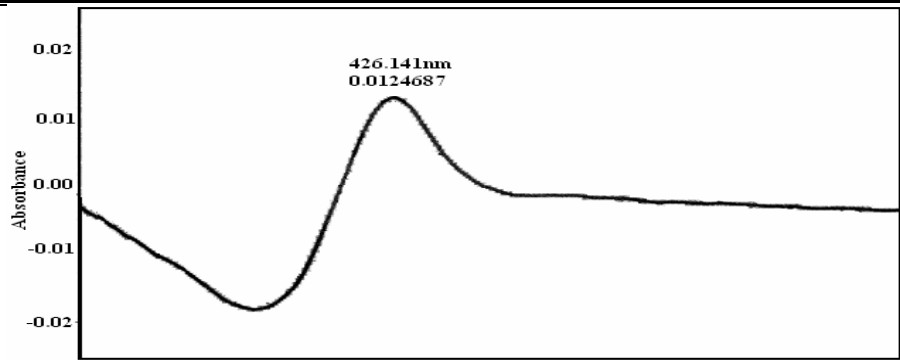


图 3-11 Cyt b5 光谱扫描曲线
Fig. 3-11 Cyt b5 spectrometer scanning file

由图 3-11, Cyt b5 的可见光吸收峰在波长 424±2.5nm 处, 且比较稳定。

3.2.1.6 喹胺醇对肝微粒体蛋白含量影响

由表 3-13 可见, 给雄性大鼠连续口服喹胺醇 7d 后, 药物处理组鼠肝微粒体蛋白水平除低剂量组外, 其它均高于对照组, 但差异不显著; 药物处理组间, 高剂量组 (I) 肝微粒体蛋白显著高于低剂量组 (IV) ($P<0.05$); 同时, 随着给药剂量的增加肝微粒蛋白亦逐渐升高。

雌鼠连续用药 7d 后, 药物处理组鼠肝微粒体蛋白含量的变化和雄鼠变化相似; 药物处理组之间, 鼠肝微粒体蛋白含量是二个高剂量组高于低剂量组, 但差异不显著, 规律性变化不明显。

由图 3-12 可见, 无论是对照组还是药物处理组, 雌鼠肝微粒体蛋白含量各组均显著高于雄鼠 ($P<0.05$)。

表 3-13 鼠肝微粒体蛋白含量
Table 3-13 Protein content of liver microsome in male rats

组别	样本数	药物剂量(mg/kg.体重)	雄蛋白含量(mg/mL)	雌蛋白含量(mg/mL)
Group	Number	Drug dose(mg/kg.BW)	Male protein content (nmol/mL)	Female protein content (nmol/mL)
I	6	400	3.5995±0.5399	5.0490±0.8035
II	6	200	3.1407±0.4895	5.2854±0.1103
III	6	100	3.0406±0.2836	4.0181±0.7633
IV	6	50	2.8118±0.4523	4.0363±0.9369
C	6	0.9% NaCl	2.9171±0.4259	4.0675±0.5412

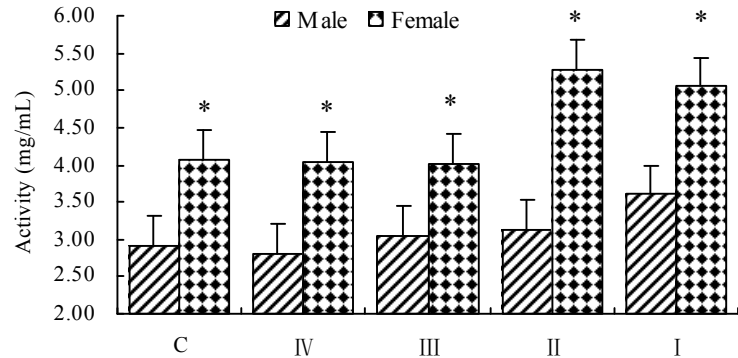


图 3-12 肝微粒体蛋白含量雌雄鼠间比较
Fig.3-12 Difference of protein content between male and female rats

3.2.1.7 喹胺醇对肝 GST 水平的影响

表 3-14 肝微粒体 GST 活性
Table 3-14 GST activity of liver microsome in rats

组别	样本数	药物剂量(mg/kg.体重)	雄 GST 活性(U/mgprot)	雌 GST 活性(U/mgprot)
Group	Number	Drug dose(mg/kg.BW)	Male GST activity (U/mgprot)	Female GST activity (U/mgprot)
I	6	400	154.76±20.27	112.30±22.22**
II	6	200	164.50±23.17	107.82±8.55**
III	6	100	180.86±10.54*	145.50±22.59*
IV	6	50	176.40±17.46	138.82±30.75
C	6	0.9% NaCl	169.12±9.60	134.95±11.33

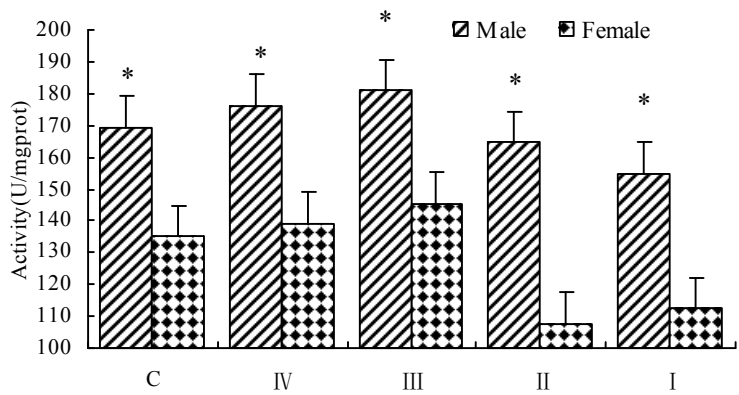


图 3-13 GST 活性雌雄鼠间的比较

Fig 3-13 Difference of GST activity between male and female rats

由表 3-14 可见，试验鼠连续口服 7d 后，雌雄鼠 50、100mg/kg 剂量组肝微粒体 GST 活性均高于相应的对照组，但只有 100mg/kg 剂量组与对照组间的差异呈显著性(P<0.05)。雄鼠 200mg/kg 以上剂量组则低于对照组，无明显统计学意义；雌鼠 200mg/kg 以上剂量组则极显著低于对照组 (P<0.01)。药物处理组之间，雌雄鼠肝微粒体 GST 的变化规律随剂量的增加均呈高-再高-低-再低的趋势，且酶活性的最高点与最低点间均呈极显著性差异 (P<0.01)。

由图 3-13 可见，无论是对照组还是药物处理组，雄性大鼠的肝微粒体 GST 活性均极显著高于雌鼠 (P<0.01)，药物剂量的变化对这种雌雄鼠间的 GST 活性差异无明显影响。

3.2.1.8 喹胺醇给药剂量与肝药酶活性间相关性

由表 3-15、3-16 可见，给药剂量与鼠肝微粒体蛋白水平间的变化呈正相关关系，这种正相关性在雄鼠有显著性关系 (P<0.05)；给药剂量与 CYP 450 水平呈负相关性；给药剂量与雄鼠 CYP b5 水平间呈微弱的负相关性，而与雌鼠 CYP b5 含量间呈正相关性；给药剂量与试验鼠肝微粒体 APND 活性间呈负相关性，雌鼠的这种相关性很显著 (P<0.05)；给药剂量与 EMND 活性间呈负相关性，雄鼠则更为明显 (P<0.05)；给药剂量与 EROD 活性间亦呈负相关关系，但均不显著；药物剂量与 GST 间也呈负相关关系，雄鼠较为显著 (P<0.05)。

表 3-15 雄鼠肝 CYP450 同工酶水平与给药剂量间的相关性

Table3-15 Correlation between CYP 450 isoenzyme activity and drug dose in male rats

	相关方程 Correlation equation	相关系数的平方 (r^2) R square	P 值 P Value
微粒体蛋白	$y = 0.0021x + 2.753$	0.9719	P<0.05
CYP450 水平	$y = -0.0003x + 0.5359$	0.6217	
CYP b5 水平	$y = -7E-05x + 0.2433$	0.0654	P<0.05
APND	$y = -0.0008x + 1.0846$	0.5812	
EMND	$y = -0.0001x + 0.1825$	0.9151	
EROD	$y = -0.0692x + 71.883$	0.8071	P<0.05
GST	$y = -0.0715x + 182.53$	0.8778	

表 3-16 雌鼠肝 CYP450 同工酶水平与给药剂量间的相关性

Table3-16 Correlation between CYP 450 isoenzyme activity and drug dose in female rats

	相关方程 Correlation equation	关系数的平方 (r^2) R square	P 值 P Value
微粒体蛋白	$y = 0.0032x + 3.9909$	0.566	P<0.05
CYP450 水平	$y = -0.0002x + 0.5507$	0.0938	
CYP b5 水平	$y = 0.0002x + 0.1883$	0.6586	
APND	$y = -0.0005x + 0.5701$	0.9594	
EMND	$y = -9E-05x + 0.1347$	0.6298	
EROD	$y = -0.0192x + 69.054$	0.6645	
GST	$y = -0.0919x + 143.35$	0.5717	

3.2.3 讨论

3.2.3.1 喹胺醇对大鼠肝总 CYP450 和蛋白含量的影响

细胞色素 P450 是机体内一种重要的生物活性物质，在药物代谢、解毒和氧化还原反应过程中起重要作用。CYP450 酶是一个超基因家族，由多种亚型组成，并发挥着不同的生物活性作用。CYP450 基因多态性，决定着药物不同个体的代谢、代谢速度、药效、毒效作用等的差异（鞠美华，1998）。研究药物对 CYP450 酶的影响，对临床安全、合理用药具有重要意义，也可以根据 P450 酶种类及其变化，推测药物或毒物在机体内的生物转化所涉及的相关反应及种类（柳晓泉,2000；Gelboin HV，2006）。除过药物或毒物对 CYP450 的影响作用外，性别、发育、遗传变异以及年龄等对 CYP450 均有不同形式的影响作用。

本研究中，给雄性大鼠连续口服不同剂量的喹胺醇 7d 后，肝微粒体 CYP450 含量均低于对照组（C），且 100mg/kg 体重以上剂量组与对照组间呈显著性差异（ $P<0.05$ ）（见表 3-8）；50mg/kg 体重剂量组大鼠 CYP450 含量显著高于其它三个剂量组（ $P<0.05$ ）。雌鼠连续用药 7d 后，药物处理组肝微粒体 CYP450 含量却高于对照组，只有 100mg/kg 以下剂量组与对照组间有差异显著性（ $P<0.05$ ）；药物处理组间，50mg/kg 剂量组鼠肝微粒体 CYP450 含量却显著高于其它三个剂量组（见图 3-5）。对照组（C）雌鼠 CYP450 酶含量极显著低于雄鼠（ $P<0.01$ ），但连续口服喹胺醇 7d 后，雌雄鼠间酶含量的差异变得不明显。

上述结果显示,连续口服喹胺醇可能对雄鼠肝微粒体总 CYP450 会产生抑制作用,对雌鼠 CYP450 却有促进作用,但是这种促进作用会随给药剂量的增大而减弱。由此推测,喹胺醇可能在雌鼠或雄鼠体内的代谢有差异。本课题组前期研究结果也表明,喹胺醇在动物机体内作用具有性别差异,表现在促生长剂量不同、提高饲料利用率的时间不同等(车业贵,2006)。这种药物的临床作用在性别间的差异是否与 CYP450 的变化不同有关,还有待深入研究。本研究结果也与喹胺醇对不同基因亚型 mRNA 的影响有相似之处。相关性分析结果还显示,给药剂量与 CYP450 酶含量间呈负相关关系。由此推测,喹胺醇对 CYP450 酶的影响总体趋势是抑制。另外,从 CYP450 在紫外-可见光下的扫描图可见,试验中 CYP450 的出峰波长稳定在 $450\pm 2\text{nm}$ 处,这与文献报道一致(唐跃年,1998)。同类药物如喹乙醇、喹烯酮、卡巴氧等是否也会导致 CYP450 同样的变化,还未见资料报道。但具有喹啉类结构的药物,如 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline 等有诱导 CYP 亚型 2E1 和 1A 等的作用(Mori Y,2006)。

3.2.3.2 喹胺醇对大鼠肝微粒蛋白含量的影响

卡巴氧、喹啉酮、喹乙醇等喹啉类药物有促生长与提高饲料利用率、改善饲料转化率和促进蛋白质同化作用有关(Carta A,2005)。本实验结果显示,雄性大鼠连续口服喹胺醇 7d 后,100mg/kg.体重以上剂量组鼠肝微粒体蛋白水平高于对照组,药物处理组之间也是随剂量增加蛋白水平呈逐渐升高趋势,但无明显统计学意义;雌鼠蛋白变化与雄鼠相似。无论是药物处理组还是对照组,雌鼠肝微粒体蛋白均高于雄鼠。该结果是否与报道中,喹啉类药物如喹胺醇等的促生长机理有关,还有待实验数据证实。

3.2.3.3 喹胺醇对大鼠肝细胞色素 b5 的影响

细胞色素 b5 (Cytochrome b5, Cyt b5) 是机体内的一种重要的氧化还原蛋白,属血红素结合蛋白,有一条多肽。在动物红细胞中,组成 Cyt b5 的多肽有 98 个氨基酸残基,Cyt b5 和 NADH-Cyt b5 还原酶一起参与高铁血红蛋白的还原反应,以维持输送氧的生理作用(Hultquist D E,1978)。肝脏中 Cyt b5 由 134 个氨基酸的蛋白肽组成,在羧基端有一段 36 个氨基酸的短肽,该肽段将 Cyt b5 固定于内质网膜上(George. SK, 1989)。肝细胞中 Cyt b5 主要与 CYP450 协同作用,在药物代谢或解毒过程中起重要作用。如 Cyt b5 协同 CYP2E1 催化类固醇、乙醇等的降解反应(Rashid MA., 1973)。Cyt b5 在吸入性麻醉剂甲氧氟烷(methoxyflurane)的代谢活化中,与 CYP2B4 一起催化该麻醉剂在机体内的代谢(Zhang H, 2005)。

本研究中,给大鼠连续口服不同设计剂量的喹胺醇 7d 后,药物处理组雄鼠肝微粒体 Cyt b5 含量均高于对照组(C),而 100mg/kg.体重以上剂量组与对照组间呈极显著性差异($P<0.01$),不同给药剂量组间的雄鼠肝微粒体中 Cyt b5 含量没有明显差异。雌鼠 100mg/kg.体重以下剂量组 Cyt b5 含量低于对照组,200mg/kg.体重以上剂量组高于对照组,但各组间均无明显统计学意义。另外,给药剂量与 Cyt b5 含量间呈正相关性。性别间也有差异,对照组雄鼠的微粒体 Cyt b5 含量明显低于雌鼠($P<0.05$);药物处理组,鼠肝微粒体 Cyt b5 含量在连续口服喹胺醇 7d 后,各剂量组对应雌、雄鼠间除二个低剂量组外,两个高剂量组也是雌鼠明显高于雄鼠($P<0.05$)。Cyt b5 在波长 $424\pm 2.5\text{nm}$ 处有一个稳定的吸收峰,这与文献报道相一致(George. SK, 1989)。上述结果提示,喹胺醇有诱导 Cyt b5 的可能,这种诱导作用对雄鼠比雌鼠敏感,雌鼠只有加大剂量才可能有诱导作用。

3.2.3.4 喹胺醇对大鼠肝 CYP450 酶同工酶活性的影响

3.2.3.4.1 喹胺醇对大鼠肝 7-乙氧基香豆素-O-脱甲基酶的影响

机体内 CYP450 亚型 CYP1A 能催化 7-乙氧基香豆素转化为香豆素, 功能与 7-乙氧基香豆素-O-脱乙基酶 (7-ethoxyresorufin O-deethylase, EROD) 相似, 所以实验研究中可以通过检测 EROD 的活性来推测 CYP1A 的活性, 因此该酶是 CYP1A 的探针性物质 (Kapoor N, et al, 2006)。EROD 是体内外评价药物的毒性作用机理、药物与 I 相代谢酶之间关系的重要生物分析 (Bioassay) 工具, 尤其是在毒理学研究中意义更大 (Peter A. Behnisch, 2001, 2002a)。如前文提到, 3-甲基胆蒎 (3-methylcholanthrene, 3-MC) 是一种杂环芳香族化合物, 具有诱导试验动物发生癌症的作用, 它在体内外均能诱导 EROD 酶活性的升高, 也能诱导 CYP1A 蛋白和 mRNA 水平的升高 (Moorthy B, 2000b)。本实验给大鼠连续口服喹胺醇 7d 后, 药物处理组鼠肝微粒体中 EROD 活性均极显著高于生理盐水组 ($P < 0.01$), 但是随给药剂量的增加该酶活性却呈下降趋势, 药物剂量与酶活性间呈负相关关系; 相同给药剂量条件下, 雌雄鼠组间该酶活性无明显差别。上述结果提示, 连续口服高剂量的喹胺醇后, 可能有诱导大鼠肝细胞 CYP1A 的作用。但这与 CYP1A1 mRNA 的研究结果呈相反变化趋势, 喹胺醇对 CYP1A1 在 mRNA 水平上没有诱导作用、甚至高剂量还有抑制的可能。由此推测, 喹胺醇诱导 CYP1A 的活性变化可能与 CYP1A1 无关, 但需更进一步研究证实。

3.2.3.4.2 喹胺醇对大鼠肝红霉素-N-脱甲基酶的影响

红霉素 N-脱甲基酶 (Erythromycin N-demethylase, EMND) 是一种 CYP3A 相关性酶, 常被用来作为评估机体内或培养细胞中 CYP3A 酶活性的高低, 并用以判断药物或外源性物质可能对 CYP3A 的诱导或抑制作用 (Vences-Mejia A, 2006)。前文所述, 地塞米松是公认的 CYP3A 的诱导剂, 试验发现给大鼠连续 3d 使用地塞米松后, 会导致外周血 EMND 活性升高 3-4 倍; CYP3A 能被酮康唑 (Ketoconazole) 所抑制, 当给大鼠一定剂量的该药后, EMND 的活性则会显著降低。无论是地塞米松所导致的 EMND 升高、还是酮康唑造成的酶活性降低, 均与 CYP3A 蛋白的变化规律相一致 (Dey A, 2006)。大鼠禁食或饥饿几天后, 其体内 EMND 也会升高; 当长期服用过量天门冬氨酸后, 也会导致 EMND 升高。分析认为, 这可能与丙酮过量有关, 因为丙酮也可诱导机体 CYP3A 处于高水平 [Vences-Mejia A, 2006; Kachula SO, 2004; Wan J, 2006]。本研究结果显示, 雄性大鼠连续口服喹胺醇 7d 后, 50mg/kg. 体重剂量组鼠肝微粒体 EMND 活性显著高于对照组 (C) ($P < 0.05$), 200、400mg/kg. 体重剂量组则极显著低于对照组 ($P < 0.01$); 药物处理组之间, 50mg/kg. 体重剂量组极显著高于其它三个剂量组 ($P < 0.01$) (见表 3-10 和图 3-8)。雌鼠连续给药 7d 后, 100mg/kg. 体重以下剂量组鼠肝微粒体 EMND 活性高于对照组 (C), 但无明显统计学意义; 200mg/kg. 体重以上剂量组鼠肝 EMND 活性极显著低于对照组 ($P < 0.01$) (见表 3-10); 药物处理组间, 100mg/kg. 体重以下剂量组极显著高于 200mg/kg. 体重以上剂量组 ($P < 0.01$)。另外, 无论是对照组还是药物处理组, 雄鼠肝微粒体 EMND 活性均极显著高于雌鼠 ($P < 0.01$)。这些试验结果提示, 大鼠连续口服剂量相对较低的喹胺醇后, 可能对肝细胞 CYP3A 亚型产生诱导作用, 但剂量再高则会对 CYP3A 亚型产生抑制现象。高剂量喹胺醇对 CYP3A 亚型的影响与 CYP3A1 mRNA 的影响具有相似之处, 即均为抑制作用; 但低剂量对 CYP3A 活性的影响却与 CYP3A1 mRNA 的

作用结果相反,这种相反的结果是何原因呢?尚不清楚,推测可能是高剂量对 CYP3A 在蛋白水平和基因水平上均有影响,而低剂量则是只对 CYP3A 蛋白水平产生某种影响。另外,喹胺醇给药剂量与肝微粒体 EMND 活性间的负相关性结果表明,随药物剂量的增加,药物对 EMND 活性的抑制作用会越强。

3.2.3.4.3 喹胺醇对大鼠肝氨基比林-N-脱甲基酶的影响

氨基比林-N-脱甲基酶 (aminopyrine N-demethylase, APND)活性的变化,与机体内多种 CYP450 酶的亚型有关,APND 活性的高低可以反应 CYP1A、CYP2A、CYP2B、CYP2D、CYP3A 的活性 (Kuzhuvelil Bhaskarannair,2006, BC Eke,2002)。也有人认为 APND 的活性变化可以反应出 CYP2E1 的变化。本实验结果,给雄性大鼠连续口服喹胺醇 7d 后,50mg/kg.体重剂量组鼠肝微粒体 APND 活性显著高于对照组 ($P<0.05$),100mg/kg.体重以上剂量组鼠肝 APND 极显著低于对照组 ($P<0.01$): 药物处理组之间,100mg/kg.体重以上剂量组鼠肝 APND 活性极显著低于 50mg/kg.体重剂量组 ($P<0.01$),100mg/kg.体重以上剂量组间无明显差别。雌鼠连续用药 7d 后,50mg/kg.体重剂量组鼠肝 APND 虽然低于对照组,但差异不显著,而其它三组均显著或极显著低于对照组 ($P<0.05$ or $P<0.01$),同时随药物剂量的增加 APND 活性的下降越显著。无论是对照组还是给药组,雄鼠肝微粒体 APND 的活性均极显著高于雌鼠 ($P<0.01$),连续口服喹胺醇对这种性别间的差异无明显影响。由此可见,低剂量的喹胺醇对雄鼠肝 APND 具有诱导作用,高低量则具有抑制作用;喹胺醇对雌鼠该酶活性可能有抑制作用;雄鼠肝微粒体 APND 活性高于雌鼠,服用药物不会对这种差异产生明显影响。前期实验结果显示,喹胺醇对 CYP2E1 mRNA 水平有抑制作用,这与高剂量喹胺醇对 APND 酶活性的影响结果一致,但低剂量则呈相反的结果。推测,高剂量的喹胺醇对 CYP2E1 在转录、转录后或蛋白质水平上均有一致的影响作用。

3.2.3.5 喹胺醇对大鼠肝 GST 活性的影响

前文述及,谷胱甘肽硫转酶 (Glutathione-s-transferase, GST)是机体重要的 II 相代谢酶之一,由两个亚单位构成的二聚体,一般根据亚单位的不同而命名。不同的生物体内, GST 的种类和数量均存在遗传多态性,这种遗传多态性与药物反应的个体差异也有一定的关系 (McIlwain CC, 2006)。GST 能催化有害的亲电子底物发生结合、转化等反应,从而使其失活,其底物包括一些环氧化物、活化的烯烃、有机过氧化氢等 (Salinas AE, 1999)。因此,该酶在解毒过程中具有重要意义。本实验结果显示 (表 3-14),给 Wistar 大鼠连续口服喹胺醇 7d 后,100mg/kg.体重以下剂量组鼠肝微粒体 GST 活性均高于或显著 ($P<0.05$) 高于对照组,200mg/kg.体重以上剂量组则低于对照组,雌鼠则极为显著 ($P<0.01$)。药物处理组间,雌雄鼠肝微粒体 GST 的变化规律随剂量的增加均呈高-再高-低-再低的趋势,且酶活性的最高点与最低点间均呈极显著性差异 ($P<0.01$),即 100mg/kg.体重剂量组极显著高于 400mg/kg.体重剂量组 ($P<0.01$)。由图 3-13 可见,雄性大鼠的肝微粒体 GST 活性均极显著高于雌鼠 ($P<0.01$),连续口服不同剂量喹胺醇 7d 后,对这种性别差异也没有明显影响。上述结果提示,低剂量的喹胺醇可能对大鼠肝 GST 具有诱导作用,也可能与代偿性增强有关,而高剂量则有抑制作用;肝 GST 活性雌雄间存在明显的性别差异,喹胺醇不会对这种性别差异产生任何明显影响。由该结果推测肝 GST 在喹胺醇的代谢过程发挥着重要作用。

第四章 喹胺醇对机体自由基代谢影响研究

近年来, 自由基医学 (Free radical medicine) 已渗透到许多学科, 成为生命科学领域的一个研究热点。随着自由基医学的发展, 其在毒理学、环境和药物安全性评价方面也具有重要意义 (方允中, 1998; 赵克然, 2000)。正常情况下, 生物体内自由基代谢水平处于平衡状态, 并在机体的正常生理功能维持方面发挥着重要作用。但当外源性物质进入机体 (如 CCl_4)、病毒或微生物入侵 (如新城疫病毒) 后、某些病理过程 (如糖尿病、动脉粥样硬化、癌症)、某些生理过程 (如衰老) 中, 自由基代谢可能会发生紊乱, 机体内自由基生成量增加或不能被清除, 达一定程度后, 大分子物质如蛋白质、RNA、DNA 会因此而发生脂质过氧化反应 (LPO), 抗氧化酶 (Antioxidant enzyme) 活性或表达量会出现异常变化 (升高或降低), 脂质过氧化产物如 MDA 等的水平也会明显升高, 组织细胞因而会发生氧应激性损伤 (Oxidative stress injury), 并导致细胞变性、坏死、凋亡等病变 (李建喜, 2006)。因此, 通过检测机体内抗氧化酶如 SOD、GSH-Px、CAT 的活性、检测 MDA 含量, 可以反应机体脂质过氧化反应程度, 间接推断自由基代谢变化和自由基水平; 用化学方法或自旋捕集技术 (ESR) 等, 直接检测组织自由基水平, 判断外源性物质或病理变化对机体的氧应激性损伤的可能性和程度 (赵世民, 1993; Lee DH, 002)。

喹胺醇和卡巴氧、喹乙醇、西吡氧、以及近年来报道的喹烯酮、喹赛多、痢菌净等一样, 均是抗菌促生长类药物性添加剂, 对革兰氏阴性菌如大肠杆菌、沙门氏菌等有明显抑制作用。但是, 随着毒理学发展和药理学作用机制研究的深入, 发现卡巴氧具有一定的毒副作用, 如精子致畸、弱致突变、光敏毒性等 (Carta A, 2005)。因此, 卡巴氧、喹啉酮等被限制使用于动物饲料添加剂。前期研究结果虽表明喹胺醇在畜产品中的残留量少、毒副作用小。但前文述及, 外源性化学物质刺激, 如四氯化碳、酒精中毒、环境污染物 (如 PHA、PB、二恶英等) 暴露等, 均会引起动物机体自由基代谢平衡失调, 并导致生物膜、DNA、蛋白质等大分子物质发生脂质过氧化或氧应激性损伤。象 PHA、PB、二恶英等属杂环芳烃类物质, 有导致机体发生氧应激性损伤的可能, 据报道如 2-氨基-3-甲基咪唑[4,5-f]喹啉等也可致自由基代谢异常 (Behrends A, 2004)。喹胺醇的母体结构为 Quinoxaline-1,4-dioxide, 也属杂环类化合物, 是否会诱发机体抗氧化机能紊乱, 并导致机体自由基水平升高呢? 无论是近年来研发的兽用喹啉类新产品, 还是已经被禁止使用的卡巴氧、喹啉酮和被限制使用的喹乙醇等, 都未有相关研究数据和资料报道。为了全面评价喹胺醇的毒性或潜在毒性作用, 有必要对其与自由基代谢和脂质过氧化损伤间的关系进行深入研究, 以确保临床用药的安全性。本实验给猪单剂量口服、静脉注射喹胺醇和给试验动物小鼠连续口服喹胺醇后, 通过检测相关抗氧化指标的变化和自由基水平变化, 分析了喹胺醇诱导氧应激性损伤的潜在性作用及其对机体自由基代谢的影响, 旨在为全面评价喹胺醇的毒理学作用补充数据, 并为拓宽兽医药理毒理学研究提供新思路和相关实验参考数据。

4.1 喹胺醇诱导仔猪氧化损伤的潜在性作用

4.1.1 材料和方法

4.1.1.1 试验动物

18 头长白与约克夏二元杂交断奶仔猪, 体重 $20 \pm 3.0 \text{kg}$, 由甘肃省原兰州种猪场提供, 随机分

为3组，每组6头，I组为口服组，II组为静脉注射组，III组为注射溶媒对照组，分笼饲喂。

4.1.1.2 试验饲料

按育成仔猪营养标准配方为依据，以玉米、麸皮、豆粕为主要组成成分，自配试验饲料，同时添加复合预混料（天津SSB-05），营养成分及含量见表4-1。

表4-1 试验饲料主要组成与营养成分

Table 4-1 Components and nutrition ingredient of experimental diets

组成与营养成分	含量	组成与营养	含量
Components and nutrition ingredients	Content	Components and nutrition ingredients	Content
玉米 (kg/100kg)	62.0	泛酸(mg/kg)	≥12
Maize (kg/100kg)		Pantothenic acid (mg/kg)	
麸皮 (kg/100kg)	8.0	烟酸(mg/kg)	≥24
Bran (kg/100kg)		Niacin	
豆粕 (kg/100kg)	25.0	生物素(mg/kg)	≥0.16
Bean cake (kg/100kg)		Biotin (mg/kg)	
预混料 (kg/100kg)	5.0	硫酸粘杆菌素(mg/kg)	20
Premix feed (kg/100kg)		Colistin sulfate (mg/kg)	
V _A (IU/kg)	≥7500	Mn (mg/kg)	≥30
V _{B2} (mg/kg)	≥4.7	Fe (mg/kg)	≥135
V _{B6} (mg/kg)	≥0.7	Cu (mg/kg)	100~200
V _{D3} (IU/kg)	≥1650	Se (mg/kg)	150~300
V _E (mg/kg)	≥22	I (mg/kg)	≥225
V _{K3} (mg/kg)	≥2.25	Ca (%)	0.8
NaCl (%)	0.375	P (%)	0.225

4.1.1.3 试验药物

喹胺醇原料药由中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所新兽药工程研究室提供，经本实验室再次纯化后得99.97%。将其配制成两种剂型，一种为胶囊制剂；另一种为注射剂，浓度为3.0 mg/mL。

4.1.1.4 给药剂量和方法

胶囊、注射剂和溶媒均为单剂量给药，胶囊经胃导管用水直接冲入胃中，剂量为300 mg/kg 体重；注射剂经耳缘静脉给药，剂量为3.3 mg/kg 体重；溶媒亦经耳缘静脉推注，剂量和注射剂量相同。

4.1.1.5 脂质过氧化相关活性物质检测

超氧化物歧化酶（SOD），采用黄嘌呤氧化酶法测定；谷胱甘肽硫转移酶（GST），采用二硝基苯显色法测定；谷胱甘肽（GSH）采用二硫代二硝基苯甲酸还原显色法测定；谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px），采用二硫代二硝基苯甲酸还原显色法测定；过氧化氢酶（CAT），采用钼酸铵显色法测定；丙二醛（MDA），采用硫代巴比妥酸（TBA）显色法。以上试剂盒均购自南京建成生物工程研究所，其余试剂均为国产分析纯。

4.1.1.6 主要仪器

Waters高效液相色谱仪（Waters，美国）；Beckman JP-6型大容量低温离心机（Beckman，美国）；Mettler Tdedo AX205分析天平（Mettler，瑞士）；GBC Cintra6型紫外可见分光光度计

(Australia)。

4.1.1.7 血药浓度检测

用反相高效液相色谱法 (RP-HPLC) 测定。

4.1.1.8 样品采集

分别在口服和静脉注射给药前后, 通过前腔静脉采集 0、0.25、0.5、0.75、1、2、4、6、8、12、16、24、48h 和 0、0.083、0.17、0.25、0.5、0.75、1、2、3、4、6、8、12、16、24、48h 的抗凝全血 2.0mL, 1.0mL 全血供抗氧化酶 CAT、GSH-Px、GSH-ST 活性和 GSH 含量检测, 1.0mL 分离血浆, 用于 MDA、SOD 和血药浓度分析。

4.1.1.9 数据分析

用 SPSS 11.0 比较给药前后均数间(MEAN±SD)的差异显著性。

4.1.2 结果

4.1.2.1 口服给药后血抗氧化酶活力和脂质过氧化产物的变化

4.1.2.1.1 口服给药后全血 GSH 和 CAT 活性变化

表 4-2 口服喹胺醇后全血 GSH 含量和 CAT 酶活性

Table 4-2 GSH content and CAT activity of blood after oral *Kuianchun*

时间 (h)	样本数	CAT	GSH
Time (h)	Number	(U/mg.Hemoglobin)	(mg/mL.blood)
0	6	0.2388±0.054	16.269±2.95
0.25	6	0.2432±0.058	15.983±3.89
0.5	6	0.2468±0.038	15.566±3.10
1	6	0.2628±0.068	14.152±1.41
2	6	0.2999±0.043*	12.856±2.22*
4	6	0.3003±0.043*	12.937±4.03*
6	6	0.2991±0.048*	13.537±2.91*
8	6	0.3299±0.025**	13.364±1.22*
12	6	0.3400±0.029**	13.638±2.40*
16	6	0.3321±0.043**	11.736±1.58**
24	6	0.4027±0.048**	13.498±1.60*
48	6	0.3857±0.094**	12.849±3.01*

注: *表示与 0 h 相比 P<0.05,**表示与 0 h 相比 P<0.01(下表同)。

Note: * represent compared with zero hour P<0.05; ** represent compared with zero hour P<0.01

Following tables are same as this

由表 4-2 可见, 断奶仔猪一次性口服剂量为 300mg/kg 体重的喹胺醇后, 全血 CAT 活性随时间延长呈逐渐升高趋势, 2-6h 显著高于给药前(P<0.05), 8-48h 极显著高于给药前 (P<0.01)。全血 GSH 含量从口服给药 2h 后显著低于给药前 (P<0.05), 并呈逐渐下降趋势。

4.1.2.1.2 口服给药后血 GSH-Px、GST 活性变化

口服喹胺后, GSH-Px 活力在给药后亦呈升高趋势, 到 0.25-2h 又逐渐降低, 后又逐渐升高直到 24h, 之后又恢复到接近给药前水平, 但活力水平与给药前相比也无显著性差异。酶活力最高点和最低点间却存在显著性差异 (P<0.05) (见图 4-1)。血 GST 活力呈升高趋势, 到 0.5h-2h 又呈下降趋势, 后又开始逐渐升高直到 16h, 之后逐渐下降并恢复到给药前水平, 但各时点该酶活力均与给药前水平相比无显著性差异 (见图 4-2)。

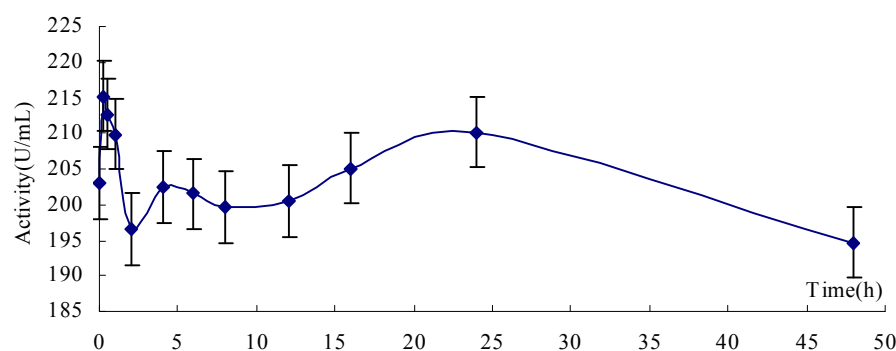


图 4-1 口服给药后全血 GSH-Px 活性

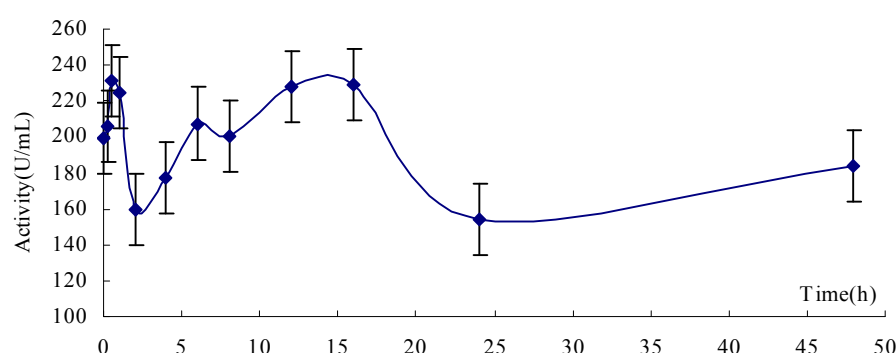
Fig. 4-1 GSH-Px activity of blood after oral administration *kuianchun*

图 4-2 口服给药后全血 GST 活性

Fig. 4-2 GST activity of blood after oral administration *kuianchun*

4.1.2.1.3 口服给药后血 SOD 活性变化

SOD 活力在口服给药后呈下降趋势，到 2-8h 一直维持在低水平，8-16h 后又逐渐升高，之后逐渐下降，48h 酶活力又恢复到给药前水平，该酶与前两种抗氧化酶活力变化一样，高水平与低水平间亦存在显著性差异 ($P<0.05$) (见图 4-3)。

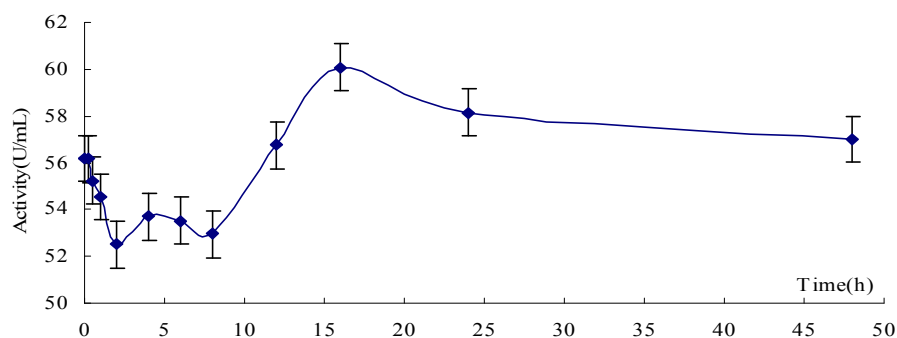


图 4-3 口服给药后血浆 SOD 活性

Fig. 4-3 SOD activity of plasam after oral administration *kuianchun*

4.1.2.1.4 口服给药后血浆 MDA 含量变化

血浆 MDA 含量在口服给药后 0-1h 呈升高趋势，1-12h 后逐渐下降到最低水平，之后又逐渐升高，48h 后接近正常水平；高水平与低水平间亦存在显著性差异 ($P<0.05$) (见图 4-4)。

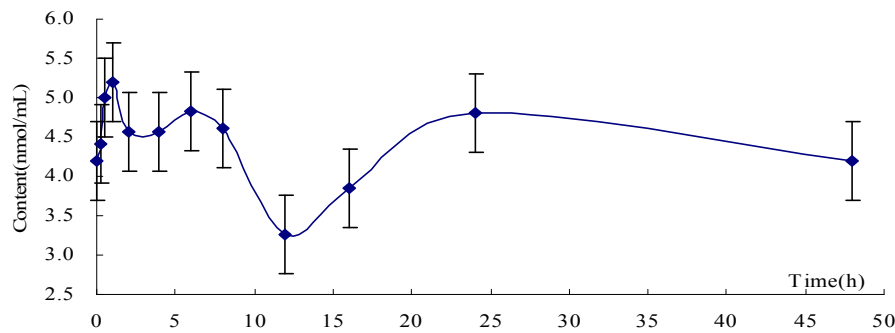


图 4-4 口服给药后血浆 MDA 含量
Fig. 4-4 MDA content of plasam after oral administration *kuianchun*

4.1.2.2 静脉注射给药后抗氧化酶活性和脂质过氧化产物变化

4.1.2.2.1 注射喹胺醇后血浆 SOD 活性和 MDA 含量的变化

表 4-3 静注喹胺醇后 SOD 活性和脂质过氧化物(MDA)含量
Table 4-3 SOD activity and MDA concentration of blood after injection *Kuianchun*

时间 (h)	样本数	静注组		溶媒组	
		Injection group		Solution group	
Time (h)	Number	SOD (U/mL)	MDA (nmol/mL)	SOD (U/mL)	MDA (nmol/mL)
0	6	46.83±7.24	2.067±0.21	46.83±8.67	2.871±0.58
0.083	6	29.48±3.60**	5.173±1.06**	42.32±6.40	2.888±1.06
0.17	6	34.63±4.89*	5.516±1.57**	44.69±8.49	3.020±1.42
0.25	6	28.28±4.47**	4.191±1.29*	43.01±4.47	3.350±0.74
0.5	6	33.37±6.46*	4.171±1.22*	43.73±6.64	3.399±1.34
0.75	6	42.53±3.17	4.379±0.42	42.00±7.31	3.020±0.56
1	6	40.54±5.50	4.521±1.57*	40.45±3.24	2.871±0.87
2	6	43.97±7.22	3.366±1.40	43.05±2.60	2.050±1.10
3	6	45.80±4.86	3.342±0.81	45.29±7.72	2.525±0.45
4	6	52.50±5.70	3.156±0.92	48.70±7.50	2.079±0.68
6	6	47.88±6.51	2.781±1.96	47.52±5.16	1.997±0.67
8	6	51.53±3.86	2.174±0.93	49.39±6.34	1.634±0.81
12	6	54.49±3.10	2.129±0.82	44.90±2.94	1.997±0.40
16	6	56.26±2.39	2.096±0.62	46.62±4.48	1.914±0.64
24	6	51.23±0.96	1.918±0.70	47.59±9.27	3.300±1.57
48	6	53.75±4.05	2.170±0.79	50.73±6.15	2.145±0.79

由表 4-3 可见，静脉注射药物组猪血浆 SOD 活性在给药后 0.083h、0.17h、0.25h 和 0.5h 时，显著低于给药前 ($P<0.05$)；0.75h 后该酶活力逐渐升高直到试验结束 (48h)，但与给药前酶活性水平相比，无显著性差异。血浆 MDA 却与 SOD 活性变化呈相反结果，即给药后 0-1h 血浆 MDA 含量显著高于对照组 ($P<0.05$)，后又下降到给药前水平。而溶媒组试验猪血浆 MDA 水平和 SOD 活性无明显的规律性变化，注射前后无显著性差异。

4.1.2.2.2 注射喹胺醇后全血 GSH-Px 活性变化

静脉注射喹胺醇后，在 0.17h、0.25h 和 0.5h 时全血 GSH-Px 活力低于给药前水平 ($P<0.05$)，

其余时间该酶活性均与给药前水平无明显差异。而溶媒组该酶活性给药前后均无显著性变化（见图 4-5）。

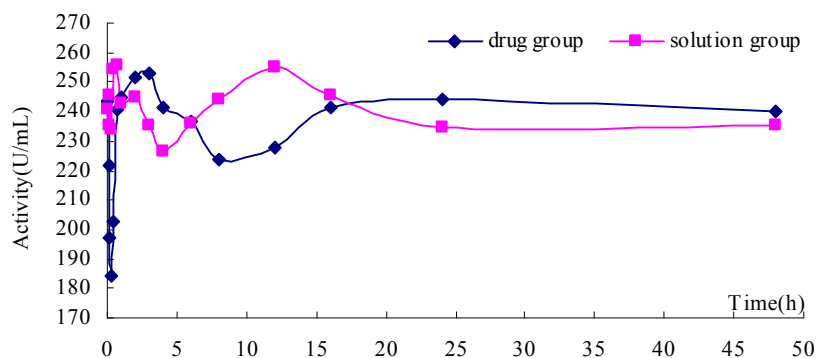


图 4-5 静脉注射喹胺醇后全血 GSH-Px 活力

Fig.4-5 GSH-Px activity of blood after injection *kuianchun*

4.1.2.2.3 注射喹胺醇后全血 GST 活性变化

静脉注射喹胺醇后，GST 活力给药后 5min 就有升高趋势，但高水平酶活性与给药前无显著性差异；到 12h 后该酶活性与给药前基本一样。而溶媒组试验猪该酶活力的变化趋势与药物组相似，各时点间也无明显差别（见图 4-6）。

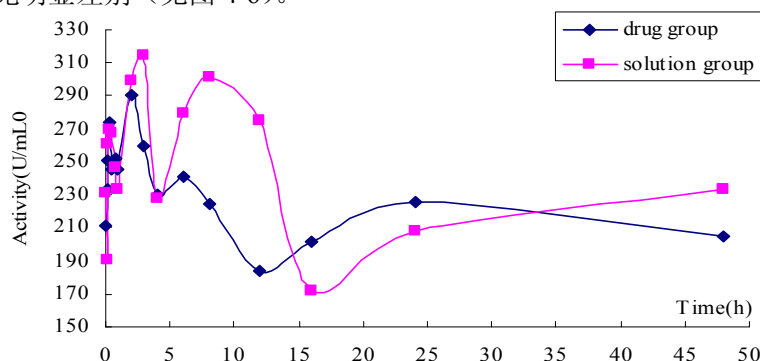


图 4-6 静脉注射喹胺醇后全血 GST 活力

Fig.4-6 GST activity of blood after injection *kuianchun*

4.1.2.2.4 注射喹胺醇后全血 GSH 含量变化

由图 4-7 可见，GSH 含量给药后 0-8h 稍有下降，但不显著，后又升高到给药前水平；溶媒组试验猪 GSH 在给药后亦呈下降趋势直到 8h 后，才开始升高并接近给药前水平。GSH 含量变化与 GST 的变化相似。

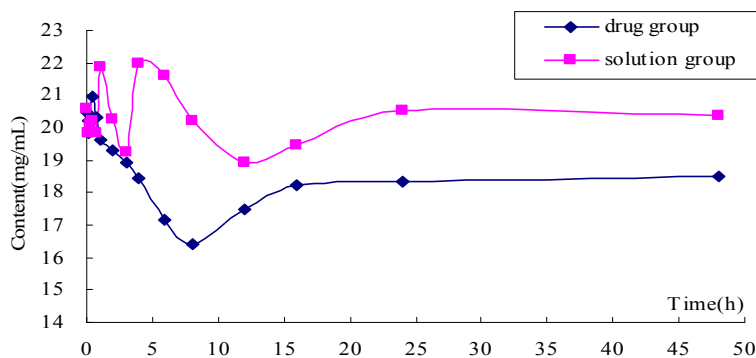


图 4-7 静脉注射喹胺醇后全血 GSH 含量

Fig.4-7 GSH content of blood after injection *kuianchun*

4.1.2.2.5 注射喹胺醇后全血 CAT 活性变化

由图 4-8 可见，无论是注射药物组还是注射溶媒组，试验猪全血 CAT 活力均无明显的规律性变化，给药前后酶活力也无明显差别。

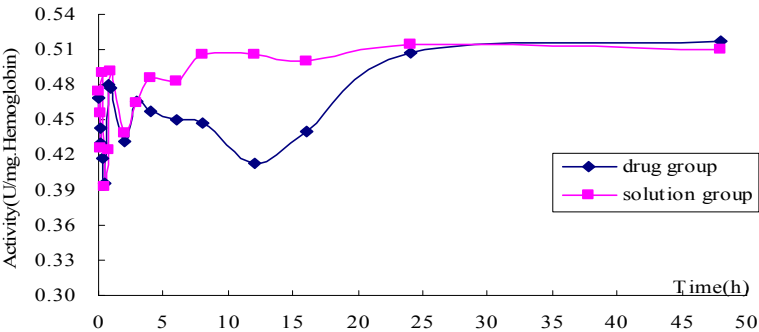


图 4-8 静脉注射喹胺醇后全血 CAT 活力
Fig.4-8 CAT activity of blood after injection *kuianchun*

4.1.2.3 单剂量给药后血药浓度变化

表 4-4 口服给药后血药浓度（单位：μg/ml）

Table 4-4 Drug concentration in plasma after oral administration <i>kuianchun</i> (Unit: μg/mL)										
	0.25h	0.5h	1h	2h	4h	6h	8h	12h	16h	24h
MEAN	0.0863	0.1522	0.2869	0.3784	0.4097	0.5109	0.4534	0.3780	0.2377	0.1935
SD	±0.056	0.110	0.137	0.137	0.142	0.127	0.101	0.082	0.045	0.0404

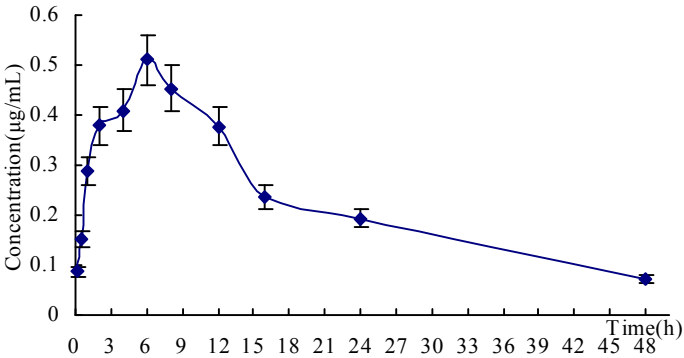


图 4-9 口服喹胺醇后血药时曲线
Figure 4-9 Plasma concentration-time curve after oral *kuianchun*

由表 4-4、表 4-5 可见，试验猪口服 300mg/kg.体重的喹胺醇后血药浓度在 6h 达最高水平，但仅为 0.5109μg/mL，之后又逐渐下降，到 24h 以后用 RP-HPLC 法已检测不到原药的存在。静脉注射 3.3mg/kg.体重的喹胺醇后，药物在猪体内的分布很快，消除也较快，到 3h 后用 RP-HPLC 法也检测不到喹胺醇的存在。

表 4-5 静注喹胺醇后血药浓度(单位：μg/ml)

Table 4-5 Drug concentration in plasma after injection <i>kuianchun</i> (Unit: μg/mL)							
	5min	10min	15min	30min	45min	60min	180min
MEAN±SD	0.6118	0.4613	0.2299	0.1549	0.0865	0.0470	0.0116
SD	0.096	0.095	0.043	0.036	0.042	0.017	0.002

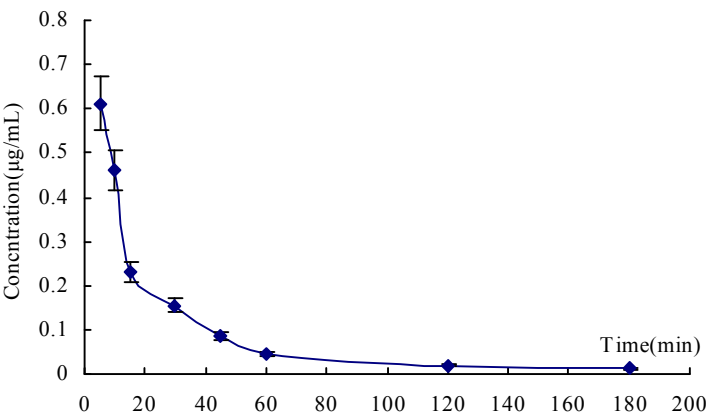


图 4-10 静脉注射喹胺醇后血药时曲线
Figure 4-10 Plasma concentration-time curve after injection *kuianchun*

4.1.2.4 各指标间相关性分析

4.1.2.4.1 血药浓度与抗氧化酶间的相关性

表 4-6 给药后血药浓度与酶、MDA 间的相关性

Table 4-6 Correlation between drug concentration and antioxidative enzyme activity or MDA content in blood		
	口服 Oral administration	静注 Injection in vein
GSH-Px	$Y=-0.0099X+2.2572, r=-0.3457, P=0.271$	$Y=-0.0050X+1.3209, r=-0.5983, P=0.089$
GSH	$Y=-0.0588X+1.0595, r=-0.4431, P=0.149$	$Y=0.0832X-1.4844, r=0.2383, P=0.537$
GST	$Y=-0.0023X+0.7319, r=-0.3292, P=0.296$	$Y=-0.0005X+0.0575, r=-0.0564, P=0.885$
CAT	$Y=-0.1113X+0.2787, r=-0.0326, P=0.920$	$Y=-2.9028X+1.4745, r=-0.3906, P=0.299$
SOD	$Y=-0.0502X+3.0362, r=-0.6167, P=0.033^*$	$Y=-0.0286X+1.276, r=-0.7943, P=0.011^*$
MDA	$Y=0.0134X+0.1847, r=0.0383, P=0.906$	$Y=0.1660X-0.4785, r=0.8044, P=0.009^{**}$

如表 4-6 所示，血药浓度的变化与抗氧化酶 SOD、GSH-Px、CAT、GST 活力、以及 GSH 含量变化间均呈负相关性，与血浆脂质过氧化产物 MDA 的含量间呈正相关性。血药浓度与 SOD 活力间负相关性尤为显著(P<0.05)，静注后血药浓度与 MDA 间的正相关性呈极显著差异(P<0.01)。

4.1.2.4.2 酶活性与脂质过氧化产物 MDA 间的相关性

试验猪口服 300mg/kg 体重的喹胺醇后，抗氧化化酶 GST、CAT、SOD 和 MDA 间呈负相关性，而 GSH-Px、GSH 和 MDA 间呈正相关性；GSH-Px、GSH 和 SOD 间呈负相关性，GST、CAT 和 SOD 间呈正相关性；GSH-Px、GST 和 GSH 与 CAT 间呈负相关性；GST、GSH-Px 和 GSH 间呈正相关性；GSH-Px 和 GST 呈负相关性。但以上相关性除 SOD 与 MDA 外，其它均为 P>0.05，即无明显统计学意义（见表 4-7）。静脉注射喹胺醇后，抗氧化酶 GSH-Px、SOD、CAT 与 MDA 间呈负相关性，而 GST、GSH 与 MDA 间呈正相关性；GST、GSH 与 SOD 间呈负相关性，GSH-Px、CAT 与 SOD 间呈正相关；GSH-Px 与 CAT 呈正相关性，GST、GSH 与 CAT 间呈负相关性，但不显著；GSH-Px 和 GST、GSH 的相关性也不明显（见表 4-8）。

表 4-7 口服喹胺醇后抗氧化酶与脂质过氧化物 MDA 间的相关性

Table 4-7 Correlation between antioxidative enzyme activity and MDA content in blood after oral *kuianchun*

	GSH-Px	GSH-ST	GSH	CAT	SOD	MDA
GSH-Px	1	$y = -10.198x + 245.66$ $R^2 = 0.0403$	$y = 0.5726x + 11.313$ $R^2 = 0.047$	$y = -0.029x + 0.4362$ $R^2 = 0.08$	$y = -2.091x + 64.894$ $R^2 = 0.2363$	$Y = 0.0314X - 1.9477$ $R^2 = 0.1487$
GSH-St		1	$y = 0.0124x + 11.377$ $R^2 = 0.0571$	$y = -0.0009x + 0.484$ $R^2 = 0.192$	$y = 0.0181x + 51.952$ $R^2 = 0.0456$	$y = -0.004x + 5.2495$ $R^2 = 0.0403$
GSH			1	$y = -0.0276x + 0.6893$ $R^2 = 0.5041$	$y = -0.1678x + 57.898$ $R^2 = 0.0106$	$y = 0.082x + 3.3208$ $R^2 = 0.047$
CAT				1	$y = 15.211x + 50.905$ $R^2 = 0.1317$	$y = -2.756x + 5.3039$ $R^2 = 0.08$
SOD					1	$y = -0.113x + 10.738$ $R^2 = 0.2363$
MDA						1

表 4-8 静脉喹胺醇后抗氧化酶与脂质过氧化物 MDA 间的相关性

Table 4-8 Correlation between antioxidative enzyme activity and MDA content in blood after injection *kuianchun* in vein

	GSH-Px	GSH-ST	GSH	CAT	SOD	MDA
GSH-Px	1	$y = -0.2304x + 289.09$ $R^2 = 0.0286$	$y = -0.0206x + 23.785$ $R^2 = 0.0992$	$y = 0.0009x + 0.2343$ $R^2 = 0.334$	$y = 0.2973x - 24.107$ $R^2 = 0.4387$	$y = -0.0288x + 9.9818$ $R^2 = 0.2339$
GSH-St			$y = 0.0212x + 14.036$ $R^2 = 0.1955$	$y = -0.0002x + 0.506$ $R^2 = 0.0358$	$y = -0.2066x + 93.313$ $R^2 = 0.3926$	$y = 0.0262x - 2.8495$ $R^2 = 0.3567$
GSH				$y = -0.0042x + 0.533$ $R^2 = 0.0286$	$y = -5.1587x + 142.78$ $R^2 = 0.5627$	$y = 0.5959x - 8.0226$ $R^2 = 0.4256$
CAT					$y = 120.94x - 10.146$ $R^2 = 0.1938$	$y = -11.348x + 8.4558$ $R^2 = 0.0967$
SOD					1	$y = -0.1141x + 8.407$ $R^2 = 0.738$
MDA						1

4.1.3 讨论

4.1.3.1 喹啉醇对抗氧化酶活性和 MDA 含量的影响

1958 年 Harman 提出了自由基医学(陈瑗, 1991), 多年来一直是人们研究的热点, 并已渗透到许多学科和研究领域。近年来, 自由基则逐渐成为人们评价外源性化学物质(如二恶英、DDT、CCl₄ 等)中毒后, 影响机体正常生理机能的重要指标之一 (Hung RJ, 2004; Farombi EO, 2000)。机体抗氧化机能的正常发挥与否, 和脂质过氧化反应、活性氧自由基代谢失调、氧应激性损伤(Oxidative stress injury)等息息相关 (Regoli F, 2002)。SOD、GSH-Px、CAT 等抗氧化酶活力、以及脂质过氧化产物 MDA 含量的变化均可直接反应机体抗氧化机能的状态, 间接反应机体自由基代谢平衡的稳定性和氧应激性损伤的可能性。

喹啉醇的母体结构为对二氮杂萘-N,N'-二氧化物, 属含氮类杂环化合物, 这类化合物可能对机体大分子物质(如 DNA、蛋白质等)有一定的损伤作用 (Peter Moller, 2002)。兽用杂环化合物(如喹啉类药物)是否会导致机体发生脂质过氧化损伤, 至今还未见明确报道。本试验结果显示, 断奶仔猪一次性口服或注射喹啉醇制剂后, 抗氧化酶 SOD 活力和脂质过氧化产物 MDA 含量, 5min 后会出现降低或升高现象, 但这种变化在给药 8h 后会逐渐恢复到给药前水平。这表明, 单剂量服用或注射喹啉醇后可能会引起机体抗氧化机能短暂失调, 但不会导致抗氧化机能长期紊乱。这与 Peter Moller 等(2002)的报道结果相一致。他们在鼠饲料中添加了不同浓度的喹啉结构衍生物 2-氨基-3-甲基咪唑并(4,5-f)喹啉, 连续饲喂大鼠 3w 后, 发现血浆 SOD 活力和 MDA 含量水平没有明显变化。本试验中, 试验动物口服大剂量喹啉醇后, 血 GSH 含量与给药前相比有明显下降趋势 ($P < 0.05$), 而 GST 活力变化则与之相反。这种变化与巯基类化合物(如 GSH 等)在机体解毒体系中所起作用相一致 (Canals S, 2001), GSH、GST 既是机体内的抗氧化活性物质成员, 又是外源性毒物清除剂 (方允中, 1989)。D Lin 等(1994)也报道, GSH 和 GST 能抑制杂环化合物喹啉类衍生物与 DNA 形成加合物, 从而保护 DNA 的损伤。CAT 和 GSH-Px 也是机体内的两种重要的抗氧化酶, 能降低 H₂O₂、有机氢过氧化物(ROOH)等的水平, 从而维持机体内羟自由基(.OH)、超氧阴离子自由基(O₂⁻)稳态, 阻止脂质过氧化反应链的进程 (Lin D, 2000)。本研究发现, 断奶仔猪大剂量口服喹啉醇后血 CAT 的活力在 8h 内有升高现象, 但 GSH-Px 无明显影响。由此可以推测, 大剂量的喹啉醇在机体内可能会导致 H₂O₂ 升高。

4.1.3.2 血药浓度与抗氧化活性物质间的相关性

喹啉醇血药浓度的变化与抗氧化酶活力间呈负相关性, 与血浆脂质过氧化产物 MDA 含量间呈正相关性。该结果提示, 喹啉醇有引起断奶仔猪抗氧化机能紊乱的可能性。但是, 试验结果又显示, 上述抗氧化酶和 MDA 等指标的变化均在给药 48h 后与给药前水平无明显差别, 这种变化可能与血药浓度低、药物代谢速度快有关。因为, 药代动力学结果显示, 口服喹啉醇后血药浓度在 6h 可达最高水平为 0.51 $\mu\text{g/mL}$, 之后又逐渐下降, 到 24h 后用 RP-HPLC 法已检测不到原药的存在; 药物的吸收半衰期为 1.63 h, 消除半衰期为 13.09 h。而静脉注射喹啉醇后, 分布半衰期为 0.1065h, 消除半衰期 0.6947h。由此可见, 喹啉醇可能不会诱导机体发生氧应激性损伤。Peter Moller 等(2002)也有相同的报道结果。

4.1.3.3 抗氧化活性物质与脂质氧化间的相关性

通常情况下, SOD、CAT、GST 等抗氧化酶活力和脂质过氧化产物间呈负相关关系; SOD 等抗氧化酶活力的大小反应机体抗氧化机能的状态, MDA 含量的高低反应机体脂质过氧化程度(赵

克然, 2000)。本试验结果显示, 试验动物单次口服 300mg/kg 体重的喹胺醇后, 抗氧化酶血 SOD、CAT、GST 活力与脂质过氧化产物 MDA 间呈负相关性, 而 GSH-Px 和 GSH 与 MDA 间呈负相关性, 但只有 SOD 与 MDA 间呈显著性负相关, 但不显著; 且抗氧化本科活性间的正相关性亦不明显。这表明, 口服高剂量的喹胺醇后对机体抗氧化酶 GSH-Px 和 GSH 的正常代谢可能有扰乱作用。静脉单次注射小剂量的喹胺后, 则是 GSH-Px、CAT、SOD 与 MDA 间呈负相关, 而 GST、GSH 与 MDA 间却呈负相关性, 抗氧化本科活性间的正或负相关性比较显著。该表明, 静脉注射喹胺醇后, 对 GST、GSH 正常代谢和机能可能有一定影响。

综上所述, 给断奶仔猪单次大剂量口服或小剂量静脉注射喹胺醇后, 有导致机体抗氧化机能紊乱的可能性, 但这种紊乱只是一过性的, 不会因此而诱导机体发生氧化应激性损伤。

4.2 喹胺醇对小鼠抗氧化机能影响研究

4.2.1 材料和方法

4.2.1.1 实验动物

200 只昆明种小鼠购自中牧公司兰州生物制药厂动物室, 体重 $25.0 \pm 3.0\text{g}$, 随机分为 5 组, 分别为高剂量组(I)、中剂量组(II)、低剂量组(III)、生理盐水组(IV)和空白对照组 (Control), 每组 40 只, 雌雄各半, 自由采食和饮水。

4.2.1.2 实验饲料

试验饲料为本实验专门加工的小鼠日粮, 未添加任何其它药物成分。

4.2.1.3 饲养方法

雌雄分笼饲养, 自由采食、自由饮水。室内温度 $24 \pm 2^\circ\text{C}$, 湿度 70%。

4.2.1.4 试验药物

喹胺醇原料药由中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所新兽药工程研究室提供, 纯度为 98.7%, 经纯化后得 99.7%的喹胺醇做受试药物, 将其配制成不同浓度的混悬液供实验用。

表 4-9 给药剂量
Table 4-9 Drug doses

	I	II	III
半数致死量 (LD_{50})			
Lethal dose, 50% (LD_{50})	1/25 LD_{50}	1/50 LD_{50}	1/300 LD_{50}
饲料添加量(mg/kg)			
Additive dose in diet(mg/kg)	1263.33	631.67	105.56
口服剂量(mg/kg.体重)			
Oral dose(mg/kg.BW)	360.0	180.0	30.0
药物浓度(mg/mL)			
Drug concentration(mg/mL)	37.9	18.93	3.17
给药体积(mL)			
Volume(mL)	0.3	0.3	0.3

4.2.1.5 给药途径和剂量

按下表喹胺醇混悬液的浓度和剂量, 分别于每天灌胃 1 次, 连续给药 30d, 再停药 10d。剂量见表 4-9。生理盐水组小鼠每天灌胃与药物等体积 0.9%的生理盐水 1 次, 空白对照组 (Control) 不作任何处理。每 5 天称体重 1 次, 然后根据体重确定每个阶段的给药量。

4.2.1.6 自由基水平及抗氧化指标检测

分别在试验的 10d、20d、30d、40d 摘眼球取抗凝全血，供谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、谷胱甘肽硫转酶(GST)、过氧化氢酶(CAT)活力和还原型谷胱甘肽(GSH)含量的测定；部分分离血清，供超氧化物歧化酶(SOD)活力和丙二醛(MDA)含量的检测。处死动物后，取肝组织制成 10%的匀浆，供羟自由基($\cdot\text{OH}$)和抗超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)水平检测。上述指标均用南京建成生物工程研究所试剂盒，在 GBC Cintra-6 型紫外可见分光光度仪上检测。

4.2.1.7 数据处理

用 SPSS 11.0 比较给药前后均数间(MEAN \pm SD)的差异显著性。

4.2.2 结果

4.2.2.1 谷胱甘肽类活性物质变化

表 4-10 小鼠全血 GSH 含量(单位: mg/mL)

Table 4-10 GSH content of mice blood (Unit: mg/mL)

组别 Group	10d	20d	30d	40d
I	20.94 \pm 4.54*	15.144 \pm 1.41	14.524 \pm 1.28	15.480 \pm 1.19
II	19.87 \pm 1.95	16.069 \pm 1.83	14.774 \pm 1.15	14.038 \pm 1.41
III	19.41 \pm 1.39	16.363 \pm 0.77	14.311 \pm 1.74	15.006 \pm 1.64
IV	18.62 \pm 1.00	16.789 \pm 1.29	15.230 \pm 1.14	14.261 \pm 1.27
Control	18.44 \pm 0.75	17.562 \pm 1.85	15.446 \pm 1.17	14.699 \pm 1.20

注：灌胃组与对照组相比，* P<0.05，** P<0.01（下表同）

Note: * represent drug treatment group compare with control, P<0.05, ** represent drug treatment group compare with control, P<0.01 (following tables are same as this)

表 4-11 小鼠全血 GSH-Px 活力(单位: U/mL.blood)

Table 4-11 GSH-Px activity in mice blood (Unit: U/mL.blood)

组别 Group	10d	20d	30d	40d
I	170.11 \pm 5.04**	291.72 \pm 7.67*	307.65 \pm 11.60*	249.86 \pm 27.87
II	168.27 \pm 8.78**	271.78 \pm 48.56*	303.39 \pm 15.59*	240.12 \pm 27.07
III	165.35 \pm 5.46**	284.45 \pm 14.42*	301.47 \pm 27.98*	239.47 \pm 18.45
IV	203.04 \pm 3.33*	293.45 \pm 17.29*	324.02 \pm 13.12	228.36 \pm 36.78
Control	234.87 \pm 5.12	329.21 \pm 21.88	331.56 \pm 12.50	245.44 \pm 7.71

表 4-12 小鼠全血 GST 活力 (单位: U/mL.blood)

Table 4-12 GST activity in mice blood (Unit: U/mL.blood)

组别 Group	10d	20d	30d	40d
I	270.37 \pm 13.15*	373.08 \pm 70.81*	466.54 \pm 96.90**	409.36 \pm 36.88**
II	240.47 \pm 28.56*	364.10 \pm 75.56*	406.6 \pm 85.63**	408.58 \pm 60.04**
III	279.28 \pm 10.57*	397.33 \pm 72.82*	515.15 \pm 68.57**	562.18 \pm 82.72**
IV	328.74 \pm 5.09	324.34 \pm 74.03	348.22 \pm 74.22*	335.96 \pm 81.55
Control	334.00 \pm 59.65	284.1 \pm 32.04	287.87 \pm 47.06	297.7 \pm 44.23

试验小鼠连续口服喹胺醇 10d 时，药物处理组小鼠全血 GSH 含量均高于生理盐水组（IV）和空白对照组（C），且高剂量组（I）与空白对照组间呈显著性差异（P<0.05）；但到实验的 20d、

30d、40d 时各组间全血 GSH 水平无明显差异（表 4-10）。药物处理组之间，各检测时点全血 GSH 含量均无明显差异。

全血 GSH-Px 活力在连续用药的第 10d 时，药物处理组极显著低于生理盐水组和空白对照组（ $P<0.01$ ）；在实验的 20d 时，药物处理组虽低于生理盐水组，但不显著，却显著低于空白对照组（ $P<0.05$ ），生理盐水组也显著低于空白对照组（ $P<0.05$ ）；30d 时，药物处理组仅显著低于空白对照组（ $P<0.05$ ），生理盐水组和空白对照组间无明显差别；40d 时各组间无明显差异（见表 4-11）。

由表 4-12 可见，10d 时药物处理组小鼠全血 GST 活力显著低于生理盐水组和空白对照组（ $P<0.05$ ），生理盐水组和空白对照组之间无明显差别；20d 时各药物处理组该酶活性均高于生理盐水组、显著高于空白对照组（ $P<0.05$ ）；连续给药 30d、再停药 10d 后，药物处理组 GST 活性均极显著高于空白对照组（ $P<0.01$ ）。药物处理组间，在试验的 10-40d 低剂量组小鼠全血 GST 活力均高于中剂量组（II）和高剂量（I）。

4.2.2.2 抗氧化酶 SOD 活力变化

血清 SOD 活力在试验 10d 时药物处理组极显著高于对照组（ $P<0.01$ ），生理盐水组也显著高于空白对照组（ $P<0.05$ ）；20d 时各组间无明显差别；30d 药物处理组极显著低于空白对照组（ $P<0.01$ ），也低于生理盐水组；40d 时各组间无明显差别。

在试验期的前 30d，低剂量组鼠血清 SOD 活力均高于高剂量组和中剂量组，但无显著性差异；到试验 40d 时药物处理组间也无明显差别。

表 4-13 小鼠血清 SOD 活力(单位: U/mL)
Table 4-13 SOD activity of mice serum (Unit: U/mL)

组别 Group	10d	20d	30d	40d
I	38.928±5.26**	33.970±7.21	21.166±4.48**	25.79±4.67
II	37.206±8.46**	35.09±7.83	19.600±4.32**	19.83±3.46
III	40.492±6.44**	37.548±9.82	25.438±5.14*	25.238±5.17
IV	30.047±6.23*	35.382±8.09	34.123±4.62	22.197±3.45
Control	20.379±5.33	35.5180±6.24	37.183±6.08	23.6271±4.60

4.2.2.3 抗氧化酶 CAT 活力变化

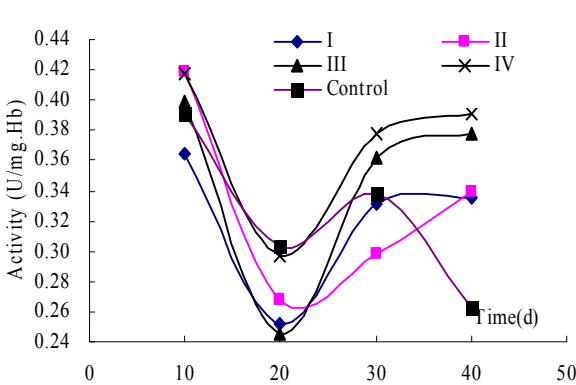


图 4-11 小鼠全血 CAT 活力
Fig. 4-11 CAT activity of mice serum

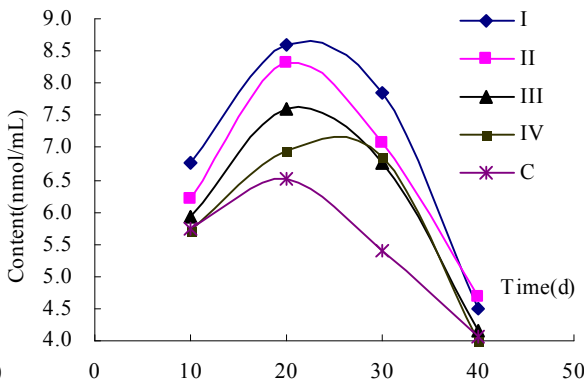


图 4-12 小鼠血清 MDA 含量
Fig. 4-12 MDA content of mice serum

由图 4-11 可见，试验的 10d 时各组间鼠全血 CAT 活性无明显差别；试验 20d 时药物处理组小鼠全血 CAT 活力显著低于生理盐水和空白对照组 ($P<0.05$)，生理盐水和空白对照组间无明显差别；30d 时低剂量组高于空白对照组，但低于生理盐水组，均无显著性统计学意义；40d 时灌胃组鼠全血 CAT 活性均高于空白对照组。药物处理组间 CAT 活性无明显差别和规律性变化。

4.2.2.4 血清 MDA 含量变化

如图 4-12 所示，试验小鼠血清 MDA 含量药物处理高剂量组和中剂量组在 10d、20d 和 30d 时均比空白对照组、生理盐水组和低剂量组高，但差异不显著；小鼠血清 MDA 在试验前 30d 时，均是高剂量组>中剂量组>低剂量组；40d 时各组鼠血清中 MDA 含量基本上无任何明显差异；随实验进程，各组鼠血清 MDA 含量呈低—高一低的变化趋势。

4.2.2.5 肝组织抗超氧阴离子水平变化

由表 4-14 可见，10d 时肝组织抗超氧阴离子水平药物处理组极显著高于空白对照组($P<0.01$)；20d 时各组间无任何明显差别；30d 时药物处理组低于对照组($P<0.05$)；40d 时只有高剂量组显著低于空白对照组($P<0.05$)。药物处理组间，低剂量组抗超氧阴离子水平在试验期内均稍高于中、高二剂量组，40d 外除 ($P<0.05$)。试验期内，各组小鼠肝组织抗超氧阴离子水平呈下降趋势（见图 4-13）

表 4-14 小鼠肝组织抗超氧阴离子水平(单位: U/mL.blood)
Table 4-14 Superoxide anion level of liver (Unit: U/mL.blood)

组别	10d	20d	30d	40d
I	757.25±86.00**	661.30±15.69	713.12±44.34*	508.05±21.05**
II	781.02±91.58**	663.59±14.25	715.66±41.79*	555.74±17.44
III	793.83±53.73**	666.70±13.19	741.66±36.66	566.08±29.17
IV	722.85±67.52	673.02±15.37	767.90±24.93	571.89±43.67
Control	651.28±87.49	680.47±45.23	759.85±58.82	561.93±39.47

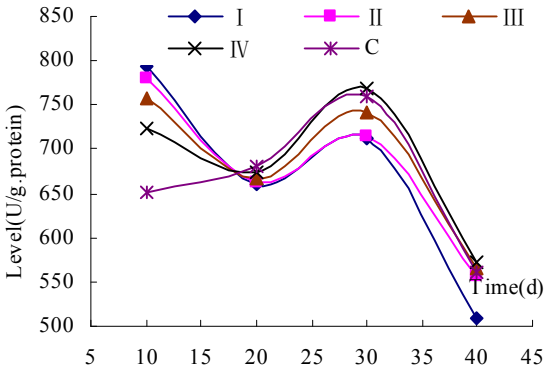


图 4-13 肝组织抗超氧阴离子水平变化趋势
Fig. 4-13 The trend of capacity of liver against superoxide anion

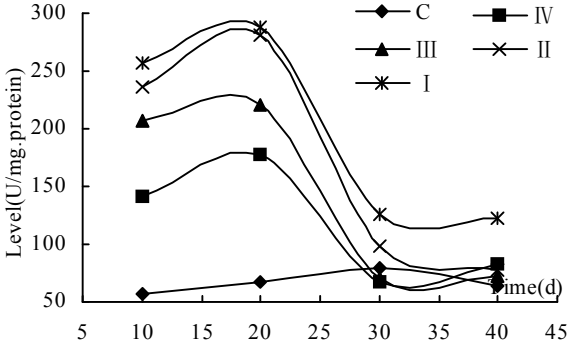


图 4-14 肝组织活性氧自由基水平变化趋势
Fig. 4-14 Level of reactive oxygen free radical in liver

4.2.2.6 肝组织活性氧自由基水平变化

由表 4-15 可见，试验的 10d、20d 时药物处理组小鼠肝组织匀浆中羟自由基($\cdot OH$)水平均极显著高于对照组($P<0.01$)、显著高于生理盐水组($P<0.05$)，30、40d 时只有高剂量组显著高于对照组 ($P<0.05$)，中剂量组和低剂量组与对照组间无明显差别。药物处理组之间，试验的 10、20、30、40d 时，高剂量组肝组织 $\cdot OH$ 水平均显著高于低剂量组($P<0.05$)；中剂量组肝 $\cdot OH$ 水平在 10-20d 时也显著高于低剂量组($P<0.05$)， 40d 时则与对照组间无明显差别；生理盐水组肝组织 $\cdot OH$ 在 30、

40d 时与空白对照组间无明显差别。如图 4-14 所示, 肝组织内·OH 自由基水平随给药期的延长, 呈由高到低的变化趋势, 10、20d 显著高于 30 和 40d ($P<0.05$)。

表 4-15 小鼠肝组织羟自由基水平(单位: U/mL.blood)

Table4-15 Hydroxy free radicals level of liver (Unit: U/mL.blood)				
组别	10d	20d	30d	40d
I	257.02±59.75**	287.08±96.97**	125.30±44.78*	122.23±22.99*
II	236.50±61.90**	281.49±85.33**	98.28±22.58	78.14±32.44
III	207.13±62.32**	221.26±54.53**	71.35±20.35	72.75±21.73
IV	140.65±22.83	178.20±45.12	67.36±22.40	81.97±14.24
Control	56.82±16.40	67.81±21.29	79.48±18.37	63.27±15.21

表 4-16 给药剂量与抗氧化酶活性间的相关性

Table 4-16 The correlation between drug dose and antioxidant enzyme activity				
	10d	20d	30d	40d
GSH	$y = 0.0047x + 19.184$ $R^2 = 0.9701$	$y = -0.0038x + 16.571$ $R^2 = 0.944$	$y = 0.0006x + 14.415$ $R^2 = 0.1985$	$y = 0.0017x + 14.527$ $R^2 = 0.1381$
GSH-Px	$y = 0.0143x + 165.2$ $R^2 = 0.967$	$y = 0.025x + 277.91$ $R^2 = 0.167$	$y = 0.0189x + 300.58$ $R^2 = 0.9737$	$y = 0.0322x + 237.03$ $R^2 = 0.8372$
GSH-ST	$y = -0.0206x + 267.29$ $R^2 = 0.0281$	$y = -0.0694x + 391.36$ $R^2 = 0.4452$	$y = -0.1315x + 487.76$ $R^2 = 0.1597$	$y = -0.4477x + 545.1$ $R^2 = 0.6993$
SOD	$y = -0.0043x + 39.686$ $R^2 = 0.1841$	$y = -0.0107x + 37.567$ $R^2 = 0.9314$	$y = -0.0122x + 24.392$ $R^2 = 0.4473$	$y = 0.0027x + 23.104$ $R^2 = 0.0186$
CAT	$y = -0.0001x + 0.4156$ $R^2 = 0.4624$	$y = 2E-05x + 0.2523$ $R^2 = 0.052$	$y = -8E-05x + 0.3469$ $R^2 = 0.193$	$y = -0.0001x + 0.374$ $R^2 = 0.7733$

4.2.2.7 给药剂量与抗氧化活性物质间的相关性

由表 4-16 可见, 给药剂量与 GSH 含量、GSH-Px 活力间呈正相关性, 但不显著; 给药剂量与 GST、SOD、CAT 活力间呈负相关性, 也无显著性统计学意义。

4.2.2.8 给药剂量与脂质过氧化产物、自由基水平间的相关性分析

由表 4-17 可见, 给药剂量与脂质过氧化产物检测指标 MDA 含量间成正相关性, 除 40d 外相关系数的平方均在 0.9 以上; 给药剂量与肝组织·OH 水平之间在试验期内均呈正相关关系, 20d 时呈极显著性 ($P<0.01$); 药物剂量与肝组织抗超氧阴离子 ($O_2^{\cdot-}$) 水平间呈负相关关系。

表 4-17 药物剂量与自由基水平、脂质过氧化产物间的相关性

Table 4-17 The correlation between drug dose and free radicals and MDAcontent				
	10d	20d	30d	40d
MDA	$y = 0.0026x + 5.8134$ $R^2 = 0.9805$	$y = 0.003x + 7.6003$ $R^2 = 0.9146$	$y = 0.0033x + 6.5994$ $R^2 = 0.9595$	$y = 0.0009x + 4.2684$ $R^2 = 0.3383$
·OH	$y = 0.15x + 205.06$ $R^2 = 0.9763$	$y = 0.1939x + 226.44$ $R^2 = 0.7707$	$y = 0.1630x + 67.33$ $R^2 = 0.9974^*$	$y = 0.1531x + 61.956$ $R^2 = 0.8681$
Anti- $O_2^{\cdot-}$	$y = -0.1115x + 798.56$ $R^2 = 0.9859$	$y = -0.0162x + 666.95$ $R^2 = 0.9806$	$y = -0.0841x + 739.46$ $R^2 = 0.7739$	$y = -0.1788x + 577.24$ $R^2 = 0.9112$

4.2.3 讨论

4.2.3.1 喹胺醇对谷胱甘肽和谷胱甘肽硫转酶的影响

4.2.3.1.1 喹胺醇对谷胱甘肽水平的影响

还原型谷胱甘肽 (GSH) 是生物体内一种重要的含有巯基 (-SH) 非蛋白活性肽, 由半胱氨酸、谷氨酸和甘氨酸组成, 广泛分布于机体的各组织器官中 (Pocsi I, 2004)。它是许多代谢酶如甘油二磷酸脱氢酶、乙二醛酶、丙酮酸脱氢酶等的辅基或辅酶, 具有多种生物学功能, 如抗脂质过氧化作用、解毒作用、药物的生物转化作用等等, 在维持细胞新陈代谢和内环境稳定性方面具有重要意义 (Flohe L, 2003; Deneke SM, 2000; Krezel A, 1999)。外源或内源亲电性化合物 (如黄曲霉毒素 B₁、自由基、苯丙芘等) 与 GSH 的 -SH 具有高的亲合性 (Lu SC, 1999; Kretzschmar M, 1990), 当这些物质进入机体或在机体内大量产生时, GSH 会与之结合而形成巯基复合物, 并被进一步转化为巯基尿酸被排出体外 (Stevens, 1989)。这就是 GSH 解毒机理, 该过程中 GSH 的含量会升高或降低, 机体的内环境和新陈代谢也会受影响, 有时甚至会出现病理性改变 (Lomaestro BM, 1995)。GSH 是评价机体抗氧化机能稳定性的一个重要标志。喹胺醇作为一种新药, 前期研究结果表明, 猪单剂量口服后全血 GSH 含量在 2-48h 有明显下降现象。本实验中小鼠连续口服喹胺醇 10d 后, 全血 GSH 含量均高于生理盐水组和空白对照组, 但只有 360mg/kg 体重剂量组与对照组间存在显著性差异 ($P < 0.05$); 在实验的 20d、30d、40d 时各组间全血 GSH 水平无明显差异 (见表 4-10); 喹胺醇给药剂量与全血 GSH 含量间呈正相关性, 但均无显著性关系。上述结果提示, 小鼠连续口服喹胺醇后, 最初可能会导致 GSH 含量代偿性升高, 但随给药时间的延长, GSH 含量又会恢复到正常水平。由此推测, 长期饲喂喹胺醇后不会对机体内 GSH 含量产生不良影响。

4.2.3.1.2 喹胺醇对谷胱甘肽硫转酶活性影响

谷胱甘肽硫转酶 (GSTs : EC 2.5.1.18) 是机体内一组多功能酶, 有许多型和亚型。真核生物中, GST 同工酶有两大类: 游离型和结合型, 游离型位于细胞浆中, 由多基因编码, 占 95%; 结合型位于膜上, 由单基因编码, 约占 5% (JD Hayes and DJ Pulford, 2006)。游离于细胞胞浆中的 GST 是由两个亚基构成的二聚体, 而结合于微粒体等膜上的 GST 由三个亚基构成, 均有一个活性中心 (Sheehan D, 2001; 1995), 并催化 GSH 与底物 (如化学致癌物、环境污染物、抗肿瘤制剂) 结合 (Boyland E, 1969)。GST 同工酶的生物学作用多种多样: 解毒功能、药物代谢功能、抗病功能和生物合成功能 (McIlwain CC, 2006; Townsend DM, 2005; Hayes JD, 2005)。如环境化学致癌物如苯丙芘的解毒, 抗癌、抗肿瘤作用, 催化白三烯、前列腺素、睾酮、孕酮等的合成, 催化酪氨酸的降解 (夏世钧, 2001)。在外源性化学物质进入机体后, 可能会对 GST 产生诱导或抑制作用, 如苯巴比妥, 3-甲基胆蒎及 TCDD 等, 均有诱导 GST 活性作用 (Wan X, 2004)。研究资料表明, 外源性化合物诱导 GST 的作用可能是一种保护机制, 该酶的亲电性底物大多是其有效的诱导剂, 而且这种诱导作用通常是可逆的, 解除诱导剂后酶浓度又会变回原来的水平 (Bello SM, 2001; Sheehan D, 1995)。如 2-(allylthio)pyrazine 既可以抑制 CYP2E1 的基因表达、抑制其介导的生物催化作用, 还能诱导环氧化物的降解、提高 GSTs 的水平, 从而降低 AFB₁ 导致的肝癌发病率 (Kim ND, 1999)。

前期实验结果表明,猪单剂量给药后对 GST 活性没有明显的影响。本实验给小鼠连续口服喹胺醇后,10d 时全血 GST 活性则显著低于生理盐水组和空白对照组 ($P<0.05$),20d 时显著高于空白对照组 ($P<0.05$),到 30d 和 40d 时极显著高于空白对照组 ($P<0.01$);但药物处理组间相比,低剂量组小鼠全血 GST 活力在试验期内均高于其它二个药物处理组(见表 4-12)。该结果提示,在给药初期可能对 GST 活性有抑制作用,但随着给药时间的延长这种抑制作用会减弱、并转变成诱导作用,这与文献报道结果相一致(Coles BF, 2003; Jones DP,1995)。但这种作用并不会因为给药剂量的增加而增大,因为低剂量组酶活性在试验期内始终高于中剂量组和高剂量组。因此,试验结果中给药剂量和酶活性的变化间存在负相关性。由上述结果推测, GST 在喹胺醇的代谢和解毒过程中起主要作用,活性变化比单剂量给药显著,而且停药后 10d 时还能观察到酶活性极显著高于对照组。

4.2.3.2 喹胺醇对抗氧化酶活性的影响

抗氧化酶(Antioxidant enzymes)是广泛分布于生物体内的一大类活性物质,如 SOD、CAT、GSH-Px、MPO、乳酸脱氢酶(Lactate Dehydrogenase)(Delvecchio FC,2005; Hwang JM,2005),硫转移酶、肌酸激酶(Creatine Kinase)等(Dunlap KL,2006; Rosa NG, 2005),具有多种生物学作用,但抗氧化应激性损伤和清除自由基是最重要作用之一(Comhair SA,2005; LoVerde PT,2004; Franco AA,1999)。疾病、生理变化、外源性化合物入侵、中毒、代谢紊乱等,均会对机体内抗氧化酶在基因水平和蛋白水平上产生一定影响。如 CCl_4 中毒、吸烟、辐射、环境二恶英等,均会导致试验动物体内或培养细胞中抗氧化酶 SOD、CAT、GSH-Px 活性升高或下降,并影响自由基代谢平衡,并导致机体内自由基水平升高,从而使组织或细胞发生脂质过氧化损伤(Imai,2004)。如当机体发生酒精或醛类物质中毒后,抗氧化酶(SOD、CAT、GSH-Px)合成会被抑制,活性也随之降低,机体抗氧化机能紊乱(Augustyniak A, 2005)。抗氧化酶 GSH-Px、SOD 在生物解毒方面也具有一定作用,如过量服用对乙酰氨基酚(Acetaminophen)或先天性过敏所导致的中毒现象,动物体内 GSH-Px、SOD 基因表达量会降低,机体对毒性的抵抗力也会下降,因此无论是经转基因使 SOD/GSH-Px 表达量增加、还是体外给予 SOD 脂质体后,都可降低对乙酰氨基酚中毒导致的死亡率(Mirochnitchenko O, 1999)。N-亚硝基二甲胺(N-nitrosodimethylamine)是一种毒性物质,具有致癌作用,给试验动物一定量的该物质后,结果发现体内抗氧化酶 CAT、GSH-Px 和 SOD 都明显低于空白对照组(Ahotupa M, 1987)。

喹胺醇是一种抗菌促生长药兽用药物,本实验室前期研究结果表明,断奶仔猪单次口服高剂量或静脉注射小剂量的喹胺醇后,在 0-8h 之内抗氧化酶活性有明显波动现象,但 12h 之后会逐渐接近给药前水平。由此推测,喹胺醇可能会导致机体抗氧化机能的短暂紊乱,但不会持久。为了进一步阐述喹胺醇对机体抗氧化机能的影响,本实验给小鼠连续口服不同剂量的喹胺醇 30d,再停药 10d 后,分别在试验的不同时段检测了抗氧化酶 GSH-Px、SOD、CAT 的活性变化。试验结果显示,全血 GSH-Px 活性在试验的 10、20、30d 时均显著或极显著低于对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$);血清 SOD 活性在 10d 时高于对照组 ($P<0.01$ or $P<0.05$),在 30d 时显著低于对照组 ($P<0.05$);全血 CAT 活性在 20d 时低于对照组,但无明显差别。停药 10d 后即试验的第 40d 时,药物处理组与对照组间抗氧化酶活性均无显著性差异, GST 除外。相关性分析结果表明,随给药剂量的增强,

喹啉醇导致 GSH-Px 活性下降的作用会减弱,这种变化和 GSH 含量随给药剂量的变化相似;但给药剂量与 SOD、CAT 活性间均呈负相关关系,药物剂量越大,酶活性会越低。文献报道中,抗生素导致抗氧化酶活性下降也多见。Handy DE(2006)报道,氨基糖苷类抗生素会诱导 GSH-Px mRNA 3'端非翻译区基因 UGA 的编码突变,从而导致细胞内 GSH-Px 水平下降。Klemens JJ(2003)报道,豚鼠连续口服 200 mg/kg/day 剂量的卡那霉素(amikacin) 28d 后,检测发现抗氧化酶 SOD、CAT、GSH-Px、GST 等均显著低于对照组。Van den Branden C(2003)报道,阿霉素(Adriamycin)也有导致大鼠体内抗氧化酶活性下降的可能。由此可见,治疗性药物在治病的过程中也可能导致机体抗氧化机能发生紊乱。

综上所述,连续口服喹啉醇对机体抗氧化酶活性均有不同程度的影响,并有导致机体抗氧化机能紊乱的可能,但停药 10d 后这种影响作用会减弱甚至消失。

4.2.3.3 喹啉醇对自由基代谢的影响

4.2.3.3.1 喹啉醇对脂质过氧化反应的影响

脂质过氧化反应(Lipid peroxidation, LPO)是一个产生自由基和自由基参与的链式反应,分为三个阶段性:启动、扩展和终止(Spiteller G.2005; Vannucchi H,2003)。生物膜富含不饱和脂肪酸,其中的双键易被带有不成对电子的自由基攻击,从而形成带有不成对电子的脂自由基(LOO·),当脂自由基间相互作用生成非自由基产物或形成环氧化物后,最后裂解成各种醛类或短链烃类,链式反应终止。丙二醛(Malondialdehyde, MDA)是脂质过氧化代表产物之一,也是检测脂质过氧化反应的生物标记物(Draper HH,1990; Foti MC,2003; Olsson KA,2002)。因此,通过检测组织内 MDA 的含量,可以推断机体脂质过氧化反应水平。疾病(如糖尿病、高血压、癌病等)过程、外源性化合物入侵(如酒精、吸烟、PAHs、丙烯酰胺等)后(Zhu YJ, 2006; 方允中, 1989),MDA 含量会升高,结合抗氧化酶活性的变化、以及细胞形态学,可以推测机体内自由基代谢水平和脂质过氧化损伤的程度(汪德清,1994; Freeman BA, 1982)。喹啉醇等喹啉类物质是否会诱导机体产生大量自由基,引起脂质过氧化反应和氧气激性损伤。前期实验结果显示,断奶仔猪单剂量口服喹啉醇后 0-12h、单剂量静脉注射喹啉醇后 0-1h 内 MDA 含量高于给药前水平,说明喹啉醇有导致机体发生脂质过氧化反应的可能,但在自身调节下这种反应不会持久,因此数小时后 MDA 又恢复到正常水平。本实验中,给小鼠连续口服喹啉醇 30d,再停药 10d 后。结果显示试验小鼠血清 MDA 含量 360mg/kg 剂量组和 180mg/kg 剂量组在 10d、20d 和 30d 时均比空白对照组、生理盐水组和 30mg/kg 剂量组高,但差异不显著;40d 时各组鼠血清中 MDA 含量无任何明显差异。另外,实验中给药剂量与血清 MDA 含量间在 10、20、30d 时均呈正相关关系,40d 时这种正相关性虽存在,但相关系数很小。该结果表明,长期服用喹啉醇后,有导致机体抗氧化机能紊乱的可能性,但导致的脂质过氧化反应很轻微;给药期间试验鼠血清 MDA 含量会随给药剂量的增加而增大,脂质过氧化反应与给药剂量间有一定相关性。

4.2.3.3.2 喹啉醇对活性氧自由基代谢的影响

自由基是带有不成对电子的活性基团,化学性质非常活泼。在需氧生物体内外,有大量的活性氧等自由基产生,并不断地被抗氧化体系如 CAT、GSH-Px、SOD 等清除,从而维持平衡状态。这些活性氧包括 NO 及其相关性产物在机体的多种生理过程中发挥着重要作用,

前列腺素、甲状腺素等的合成和级联反应中, 自由基是一种不可缺少的活性元素; 氧自由基与 CO_2 形成的“活性碳”, 在凝血酶原合成中发挥羧化作用等等 (Djordjevic VB, 2004; Fang YZ, 2002)。由于自由基与生物大分子物质如脂质、蛋白质、核酸等具有高的亲合性, 因此当自由基代谢平衡失调后, 会导致氧应激发生, 大量自由基会通过破坏不饱和脂肪酸 (Poly Unsaturated Fatty Acids, PUFAs) 的弱键, 导致生物膜等发生氧应激性损伤 (Yung LM, 2006; WEBSTER N. R, 1988)。在疾病、营养缺乏、外源化学物质入侵后, 会导致自由基抗氧化体系受损, 自由基因此会在体内积聚, 并导致脂质过氧化损伤。据报道, 许多环境污染物、药物均有引起机体内自由基生成增加或清除障碍的可能。如 CCl_4 中毒导致的肝病患者体内, $\cdot\text{CCl}_3$ 与分子氧 (O_2) 发生反应而生成 $\cdot\text{CCl}_3\text{O}_2$ 自由基, 该自由基又会导致脂质发生氧化反应, 从而损伤肝细胞 (Dwivedi S, 2006; Singab AN, 2005)。抗菌药呋喃妥英 (nitrofurantoin) 是一种硝基化合物, 在肺内质网内可被还原成硝基自由基, 该自由基又被氧化而产生 O_2^- , 后者又生成 H_2O_2 , 并导致机体发生过氧化损伤 (Nunez-Vergara LJ, 2000; Shen W, 1996)。氯霉素 (Holt DE, 1997)、环孢霉素 (Serino F, 1993)、非那西汀 (phenacetin) (Fischer V, 1986)、异烟肼 (isoniazid) (Loots DT, 2005) 等药物, 在机体内均有导致自由基生成增多, 脂质过氧化加剧的可能。

文献报道, 在厌氧条件下喹啉醇和喹啉-N,N'-1,4-二氧化物的衍生化合物能使细菌产生自由基, 可用电子顺磁共振 (ESR) 进行检测 (Suter W, 1978)。喹啉醇是喹啉-N,N'-1,4-二氧化物的衍生化合物, 猪连续单剂量口服或静脉注射该药后, 结果显示该药有导致机体抗氧化机能紊乱的可能。本实验通过检测肝组织羟自由基 ($\cdot\text{OH}$) 水平的变化, 评估了喹啉醇对活性氧自由基代谢的影响。结果给小鼠连续口服 30d 喹啉醇后, 在 10、20d 时药物处理组和生理盐水组的羟自由基 ($\cdot\text{OH}$) 水平均高于空白对照组 ($P<0.01$), 30 和 40d 时仅 360mg/kg 剂量组鼠肝 $\cdot\text{OH}$ 水平显著高于对照组 ($P<0.05$), 但与生理盐水组间无明显差别。给药剂量与肝 $\cdot\text{OH}$ 水平变化间呈正相关关系。这些结果提示, 喹啉醇可诱导机体内活性氧自由基的大量生成或积聚。分析认为, 自由基水平升高一方面与抗氧化酶活性下降有关, 另一方面可能与每天灌药时的应激反应有关。因为, 实验的前 20d 自由基水平明显高于后 20d。但随着试验鼠对灌药行为的适应, 应激导致自由基产生的可能性降低, 所以试验后期肝组织自由基水平下降明显。但高剂量组仍显著高于对照组。由此可见, 小鼠连续口服小剂量的喹啉醇后, 只会在给药初导致自由基生成增加, 但大剂量口服喹啉醇后, 这种诱导自由基生成作用会明显加剧。

4.2.3.3.2 喹啉醇对机体抗自由基能力的影响

上述试验结果表明, 喹啉醇可降低抗氧化酶 SOD、CAT 的活性, 但 GSH-Px 的活性则呈升高趋势, 活性氧自由基水平也会随给药剂量的增加而升高。这说明机体的抗氧化机能可能被抑制。机体清除自由基的能力又会怎样呢? 本实验中, 通过检测机体抗超氧阴离子 (O_2^-) 的水平, 评估了机体清除自由基的能力, 结果显示, 鼠连续口服喹啉醇 10d 时, 肝组织抗超氧阴离子水平极显著高于空白对照组 ($P<0.01$), 20d 时各组间无任何明显差别, 30d 时低于对照组 ($P<0.05$), 40d 时只有 360mg/kg 剂量组显著低于空白对照组 ($P<0.05$); 给药剂量与抗 O_2^- 的水平间呈负相关, 可见随给药剂量的增加, 肝组织抗 O_2^- 的能力会下降。上述结果提示, 在给药初期随自由基生成量的增加。机体清除自由基的能力会代偿性增加, 当自由基水平增加到一定程度即 20d 时, 清除自由基的能力会下降, 但当实验 30d 时自由基水平降低后, 清除自由基的能力又会升高。

第五章 喹胺醇对鼠腹腔巨噬细胞 NO 和细胞因子影响

5.1 不同添加剂量喹胺醇对大鼠血液学和组织病理学影响

5.1.1 材料与方法

5.1.1.1 试验动物与分组

50 只 Wistar 大鼠，雌雄各半，购于兰州军区陆军总医院动物室，随机分为 5 组，分别为高剂量组（I）、较高剂量组（II）、中剂量组（III）、低剂量组（IV）和空白对照组（C）。饲料为大鼠颗粒日粮，未添加任何其它药物。雌雄分笼饲养，自由采食、饮水。

5.1.1.2 试验药物、剂量和给药途径

试验药物喹胺醇由中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究新兽药工程实验室提供，纯度 98.7%，本实验室再行纯化，纯度为 99.97%。将喹胺醇配制成不同浓度的混悬液，分别按表 5-1 设计的药物剂量灌胃大鼠，对照组以 0.9%的生理盐水代替药物。

表 5-1 给药剂量

Table 5-1 Drug dose

	I	II	III	IV
Dose (mg/kg.BW)	80.0	40.0	20.0	10.0
Additive dose (mg/kg.diet)	600.0	300.0	150.0	75.0

5.1.1.2 试验设计

分别在试验的 0、10、20、30、40d 尾静脉采血，在血细胞分析仪上分析血细胞变化；每 5d 称体重 1 次，以确定阶段性给药量；每天统计饲料消耗，分析体增重；在 40d 时，断颈处死，测量脏器系数，取肝、心、肾、脾、卵巢、睾丸做组织病理学观察。

5.1.2 结果

5.1.2.1 体增重

表 5-2 雄鼠体增重(g/5d)

Table 5-2 Gain of body weight in male rats (g/5d)

Time(d)	C	IV	III	II	I
5	18.50±3.3	14.90±2.7	20.06±4.5	5.33±2.1	4.40±1.0
10	14.50±3.8	11.67±2.8	13.68±0.7	13.17±2.5	10.00±1.9
15	13.25±4.6	8.50±2.7	15.25±4.2	4.88±2.8	6.25±0.9
20	30.50±5.6	37.60±3.5	46.50±2.5*	30.60±4.3	36.83±7.1*
25	9.83±1.5	7.50±3.4	10.38±3.1	9.60±4.2	7.70±2.5
30	10.00±2.3	12.60±1.2	13.40±2.9	12.02±2.7	13.33±5.0
35	11.83±0.6	18.17±12.8	15.83±1.9	6.25±1.7	9.38±2.4
40	7.70±1.8	14.20±2.9	12.80±1.8	13.83±3.0	14.17±1.0
MEAN±SD	14.51±7.26	15.64±9.51	18.49±11.66	11.96±8.32	12.76±10.27

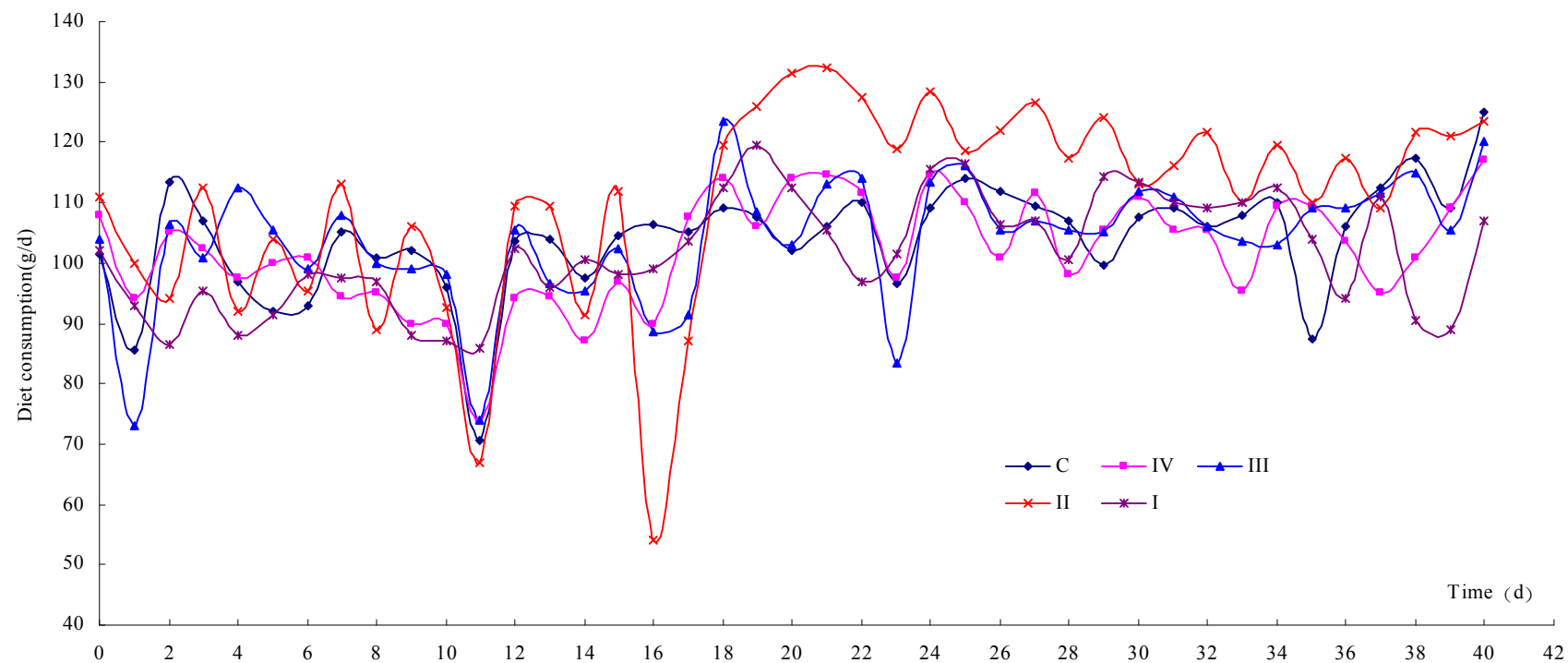


图 5-1 雄鼠饲料日消耗量

Fig. 5-1 Diet consumption per day in male rats

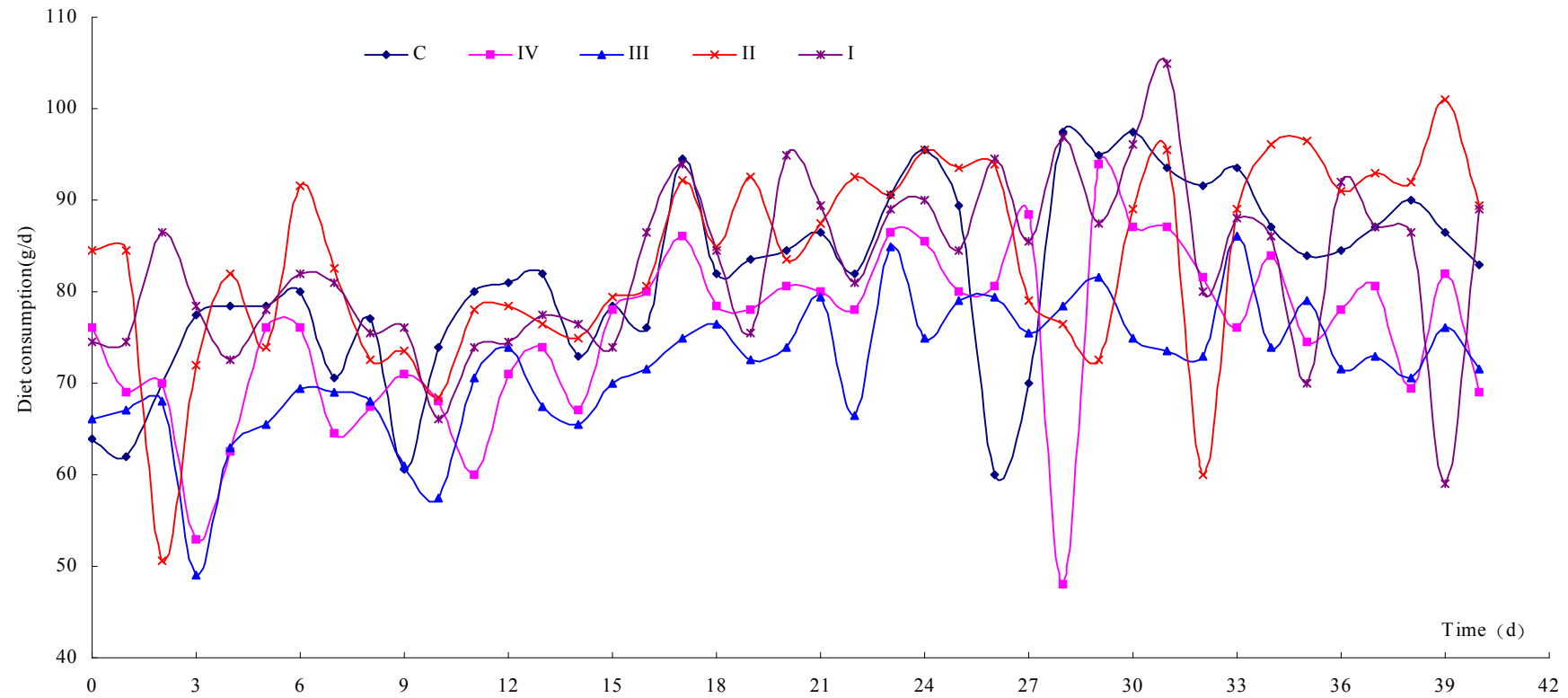


图 5-2 雌鼠饲料日消耗量

Fig. 5-2 Diet consumption per day in female rats

如表 5-2 所示, 喹胺醇对雄鼠的促生长作用集中在 15~25d 之间, 中剂量组体增重显著高于对照组($P<0.05$), 低剂量组体增重也高于对照组。如表 5-3 所示, 喹胺醇对雌鼠的促生长作用也集中在 15~25d 之间, 低剂量组大鼠体增重高于其它药物处理组和对照组, 但差异不显著。

表 5-3 雌鼠体增重(g/5d.只)

Table 5-3 Gain of body weight in male rats (g/5d.per rat)

Time(d)	C	IV	III	II	I
5	4.83±1.4	2.80±0.5	2.80±0.9	2.80±0.6	3.48±1.6
10	4.04±1.7	6.83±2.1	2.33±0.5	4.67±0.8	3.93±1.5
15	3.75±1.1	7.50±1.4	2.12±1.0	2.90±1.1	2.00±1.2
20	10.97±1.3	14.50±6.4	13.05±0.8	11.33±1.5	12.00±2.0
25	6.20±1.4	6.67±1.8	6.30±0.8	5.83±2.6	7.83±2.5
30	8.83±1.6	9.40±2.6	6.50±2.2	6.17±1.6	6.50±0.9
35	5.25±1.8	5.10±0.7	5.33±2.0	3.00±1.5	2.40±1.6
40	4.88±1.4	5.30±1.3	4.95±1.9	3.50±1.5	3.20±1.7
MEAN±SD	6.09±2.5	7.26±3.5	5.42±3.5	5.03±2.9	5.17±3.4

5.1.2.2 喹胺醇对大鼠饲料消耗的影响

由图 5-2 可见, 雌鼠中剂量组和低剂量组饲料平均日消耗量均低于其它三组。雄鼠饲料平均日消耗量则是较高剂量组高于对照组, 中、高和低剂量组间日消耗量无明显规律变化和差别(见图 5-1)。

5.1.2.2 喹胺醇对大鼠组织形态学变化的影响

5.1.2.2.1 脏器系数

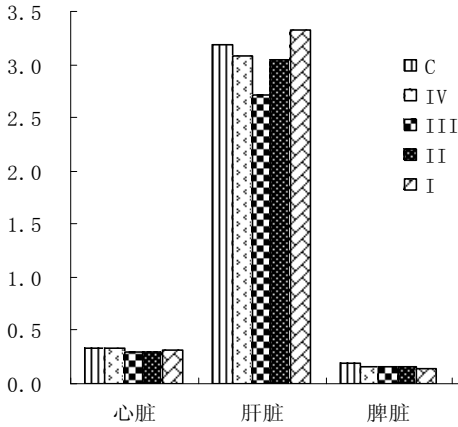


图 5-3 雌鼠脏器系数

Fig. 5-3 Viscera coefficient in female

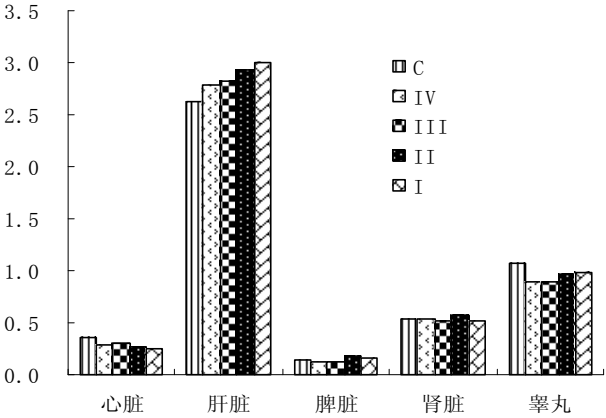


图 5-4 雄鼠脏器系数

Fig. 5-4 Viscera coefficient in male

图 5-3 和图 5-4 所示, 雌鼠肝脏系数中剂量组略低于其它各组, 而高剂量组则略高于其它各组无显著性差异; 雄鼠肝脏系数和给药剂量间呈剂量-效应关系, 药物处理组肝脏系数均高于对照组, 睾丸系数则是药物处理组低于对照组。肾脏、心脏、脾脏系数雌雄鼠各组间均无差别和规律性变化。

5.1.2.2.2 组织形态学观察

组织解剖学发现, 高剂量组有 1 例雌鼠子宫角肿大, 但卵巢色泽和大小均正常; 1 例肝脏表面有出血点; 中剂量组 1 例雄鼠呈脂肪肝。除此之外, 其它鼠均未见任何肉眼组织学异常变化。

如图 5-5 所示，除上述几例外，镜检也未见任何组织病理学异常变化。

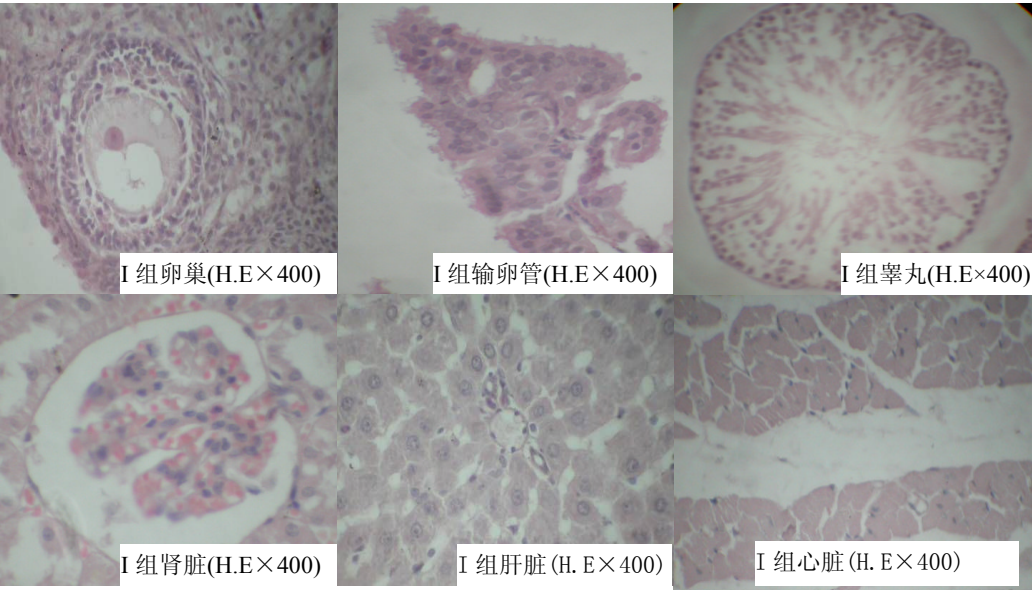


图 5-5 组织形态学观察

Fig. 5-5 Histopathology

表 5-4 大鼠血小板

Table 5-4 Blood platelet

组别 Group	检测时间(d) Time(d)	血小板 PLT ($\times 10^9/L$)	血小板压积 PCT (ml/L)	平均血小板体积 MPV (fL)	血小板分布宽度 PDW (%)
I	0	728.8 \pm 236.6	4.66 \pm 1.85	6.83 \pm 0.52	7.08 \pm 1.12
	10	714.5 \pm 149.5	4.31 \pm 1.27	6.98 \pm 0.72	6.62 \pm 0.99
	20	920.8 \pm 125.4	6.21 \pm 0.91	6.75 \pm 0.38	6.96 \pm 0.90
	30	745.1 \pm 177.5	4.90 \pm 1.36	7.08 \pm 0.58	7.06 \pm 1.01
	40	890.1 \pm 126.3	6.42 \pm 1.55	7.72 \pm 0.50	9.09 \pm 1.78
II	0	699.8 \pm 158.0	4.72 \pm 1.27	6.70 \pm 0.37	6.66 \pm 0.78
	10	853.2 \pm 127.9	5.48 \pm 0.85	6.43 \pm 0.25	6.34 \pm 0.58
	20	880.3 \pm 130.4	5.76 \pm 0.94	6.55 \pm 0.36	6.64 \pm 0.80
	30	727.4 \pm 136.6	5.09 \pm 0.92	7.04 \pm 0.54	7.18 \pm 1.25
	40	815.7 \pm 210.6	5.99 \pm 1.39	7.44 \pm 0.49	8.34 \pm 1.52
III	0	803.6 \pm 82.7	5.10 \pm 0.71	6.79 \pm 0.35	6.86 \pm 0.72
	10	888.7 \pm 89.9	5.72 \pm 0.63	6.44 \pm 0.24	6.64 \pm 0.76
	20	923.3 \pm 85.1	6.45 \pm 1.01	7.07 \pm 0.55	7.04 \pm 0.84
	30	783.7 \pm 136.3	5.54 \pm 1.03	7.09 \pm 0.59	7.28 \pm 0.84
	40	749.1 \pm 260.4	5.86 \pm 2.04	7.53 \pm 0.37	8.24 \pm 1.55
IV	0	776.3 \pm 220.4	4.81 \pm 1.65	6.84 \pm 0.47	6.96 \pm 1.35
	10	911.3 \pm 105.4	6.00 \pm 0.83	6.58 \pm 0.39	6.70 \pm 0.82
	20	923.1 \pm 105.8	6.52 \pm 0.92	6.92 \pm 0.44	7.24 \pm 0.75
	30	784.9 \pm 148.3	5.29 \pm 0.93	6.77 \pm 0.51	6.90 \pm 0.87
	40	828.9 \pm 229.6	6.15 \pm 1.51	7.55 \pm 0.66	8.16 \pm 1.57
C	0	800.0 \pm 127.7	5.11 \pm 1.59	6.98 \pm 0.44	6.82 \pm 0.97
	10	845.4 \pm 111.6	5.51 \pm 0.78	6.52 \pm 0.39	6.40 \pm 0.72
	20	901.9 \pm 104.2	5.83 \pm 0.71	6.46 \pm 0.11	6.74 \pm 0.56
	30	741.3 \pm 148.4	5.10 \pm 0.96	6.91 \pm 0.29	6.70 \pm 1.22
	40	879.7 \pm 153.5	6.29 \pm 1.13	7.17 \pm 0.49	7.60 \pm 1.09

5.1.2.3 喹胺醇对血细胞影响

表 5-5 大鼠血白细胞
Table 5-5 White blood cell in rats

组别 Group	检测时间 (d) Time(d)	白细胞 WBC ($\times 10^9/L$)	淋巴细胞 LY ($\times 10^9/L$)	中间细胞 MO ($\times 10^9/L$)	粒细胞 GR ($\times 10^9/L$)	淋巴细胞百分比 LY (%)	中间细胞百分比 MO (%)	粒细胞百分比 GR (%)
I	0	16.16 \pm 6.47	10.12 \pm 3.98	2.36 \pm 1.11	3.68 \pm 1.75	64.40 \pm 9.47	14.20 \pm 3.07	21.15 \pm 6.92
	10	19.57 \pm 6.36	11.11 \pm 3.52	2.32 \pm 0.53	6.14 \pm 2.80	56.81 \pm 5.31	12.28 \pm 2.09	30.92 \pm 5.39
	20	30.32 \pm 9.20	17.82 \pm 3.04	3.24 \pm 0.63	10.26 \pm 5.45	56.08 \pm 5.94	11.19 \pm 2.79	32.72 \pm 6.09
	30	26.72 \pm 9.76	19.70 \pm 6.57	0.46 \pm 0.27	6.20 \pm 2.54	76.28 \pm 8.81	2.18 \pm 1.28	20.41 \pm 5.87
	40	31.16 \pm 17.46	28.06 \pm 7.17	0.502 \pm 0.34	7.71 \pm 2.85	74.03 \pm 7.26	2.10 \pm 1.38	23.52 \pm 7.14
II	0	17.63 \pm 5.55	10.50 \pm 3.21	2.64 \pm 1.34	4.49 \pm 2.35	62.1 \pm 13.33	14.61 \pm 4.63	23.28 \pm 9.85
	10	21.42 \pm 6.02	11.21 \pm 3.24	3.23 \pm 0.88	6.98 \pm 2.42	52.65 \pm 6.12	15.14 \pm 1.97	32.22 \pm 5.46
	20	23.21 \pm 4.14	14.50 \pm 2.63	2.58 \pm 0.62	6.13 \pm 1.75	62.54 \pm 6.02	11.13 \pm 2.23	26.34 \pm 4.47
	30	25.11 \pm 14.54	17.21 \pm 8.46	0.62 \pm 0.57	8.63 \pm 4.46	74.99 \pm 13.63	7.36 \pm 3.40	19.87 \pm 10.17
	40	39.22 \pm 17.12	28.08 \pm 6.37	0.583 \pm 0.41	10.12 \pm 4.68	71.52 \pm 12.32	2.52 \pm 1.83	24.96 \pm 10.55
III	0	16.59 \pm 4.08	9.81 \pm 1.85	2.48 \pm 0.88	4.30 \pm 1.71	59.88 \pm 5.94	14.77 \pm 2.48	25.34 \pm 5.20 \pm
	10	19.00 \pm 4.25	10.49 \pm 2.01	2.54 \pm 0.87	5.66 \pm 2.27	57.21 \pm 6.98	13.68 \pm 2.59	29.03 \pm 5.61
	20	20.32 \pm 4.47	13.00 \pm 2.47	2.10 \pm 0.47	5.22 \pm 1.82	64.34 \pm 4.79	10.37 \pm 1.48	25.37 \pm 3.95
	30	26.29 \pm 10.86	16.69 \pm 6.51	1.49 \pm 1.21	6.77 \pm 4.26	67.35 \pm 17.85	9.84 \pm 4.01	25.18 \pm 13.29
	40	46.23 \pm 15.79	29.53 \pm 8.72	0.403 \pm 0.28	9.84 \pm 3.60	72.32 \pm 10.22	0.72 \pm 0.43	23.80 \pm 10.12
IV	0	19.46 \pm 7.00	11.94 \pm 3.94	2.72 \pm 0.97	4.83 \pm 2.55	61.49 \pm 6.69	14.31 \pm 2.92	23.67 \pm 5.21
	10	20.18 \pm 6.24	12.14 \pm 3.15	2.45 \pm 0.72	5.59 \pm 2.68	61.07 \pm 6.81	12.22 \pm 1.73	26.69 \pm 6.00
	20	26.67 \pm 4.27	15.70 \pm 2.40	2.95 \pm 0.65	8.02 \pm 2.41	59.12 \pm 5.76	11.08 \pm 2.00	29.78 \pm 5.04
	30	24.96 \pm 10.51	16.27 \pm 7.51	1.03 \pm 0.92	7.37 \pm 3.49	72.42 \pm 13.49	9.07 \pm 3.12	20.99 \pm 10.22
	40	41.43 \pm 15.94	31.63 \pm 6.80	0.710 \pm 0.45	11.47 \pm 5.72	70.38 \pm 3.80	1.01 \pm 0.39	25.49 \pm 5.82
C	0	18.01 \pm 7.46	10.96 \pm 5.04	2.60 \pm 0.88	4.46 \pm 2.14	59.54 \pm 8.44	15.60 \pm 4.39	24.83 \pm 5.19
	10	21.40 \pm 6.88	12.06 \pm 3.31	3.01 \pm 0.95	6.33 \pm 3.16	57.29 \pm 7.75	12.79 \pm 5.35	25.67 \pm 10.57
	20	27.95 \pm 7.81	16.19 \pm 3.29	3.63 \pm 1.37	10.13 \pm 5.24	56.08 \pm 8.32	11.89 \pm 2.09	31.95 \pm 7.14
	30	25.86 \pm 7.43	16.42 \pm 4.18	1.92 \pm 1.59	6.95 \pm 2.31	72.46 \pm 13.57	7.45 \pm 4.13	18.09 \pm 11.07
	40	42.68 \pm 26.55	43.22 \pm 7.86	0.644 \pm 0.50	17.7 \pm 5.83	69.18 \pm 9.21	1.06 \pm 0.87	24.40 \pm 12.82

表 5-6 大鼠血白细胞
Table 5-6 Red blood cell in rats

组别 Group	检测时间 (d) Time(d)	红细胞 RBC ($\times 10^9/L$)	血红蛋白 Hgb (g/L)	红细胞压积 HCT (L/L)	平均红细胞体积 MCV (fL)	平均血红蛋白量 MCH (pg)	平均血红蛋白浓度 MCHC (g/L)	红细胞分布宽度 RDW (%)
I	0	7.02 \pm 0.91	134.6 \pm 17.95	0.415 \pm 0.05	59.09 \pm 2.15	19.14 \pm 0.84	324.1 \pm 17.2	13.97 \pm 1.37
	10	8.19 \pm 1.94	147.8 \pm 35.10	0.491 \pm 0.17	55.65 \pm 1.84	17.41 \pm 3.04	322.1 \pm 25.1	13.48 \pm 1.14
	20	7.27 \pm 1.23	152.2 \pm 26.8	0.41 \pm 0.07	56.91 \pm 1.20	20.86 \pm 0.28	366.8 \pm 9.8	14.53 \pm 0.65
	30	7.45 \pm 1.40	158.7 \pm 27.7	0.40 \pm 0.07	53.68 \pm 2.90	21.32 \pm 0.81	397.7 \pm 13.7	16.83 \pm 0.90
	40	8.83 \pm 1.35	191.1 \pm 28.8	0.42 \pm 0.17	53.72 \pm 3.20	21.61 \pm 0.70	402.8 \pm 15.8	17.19 \pm 0.80
II	0	7.54 \pm 0.58	143.2 \pm 13.99	0.442 \pm 0.05	58.56 \pm 2.70	18.95 \pm 0.71	323.9 \pm 10.9	14.00 \pm 1.49
	10	7.66 \pm 1.38	145.3 \pm 23.34	0.434 \pm 0.06	56.86 \pm 3.23	18.98 \pm 0.83	334.1 \pm 8.4	13.53 \pm 1.64
	20	7.59 \pm 1.10	153.9 \pm 18.5	0.43 \pm 0.05	56.74 \pm 2.12	20.31 \pm 0.96	357.8 \pm 10.9	14.33 \pm 0.88
	30	7.41 \pm 1.21	158.3 \pm 24.8	0.39 \pm 0.07	53.24 \pm 2.10	21.36 \pm 0.69	401.6 \pm 16.1	16.58 \pm 0.95
	40	8.65 \pm 1.80	183.10 \pm 39.9	0.48 \pm 0.12	54.85 \pm 3.92	21.11 \pm 1.07	385.8 \pm 22.3	16.82 \pm 1.04
III	0	6.79 \pm 1.08	131.8 \pm 20.83	0.1523 \pm 0.72	15.49 \pm 0.90	15.15 \pm 0.87	14.33 \pm 0.88	14.53 \pm 0.65
	10	7.81 \pm 0.88	151.2 \pm 16.11	0.451 \pm 0.05	57.84 \pm 2.45	19.37 \pm 0.76	335.0 \pm 13.8	16.29 \pm 3.69
	20	7.07 \pm 1.07	149.2 \pm 16.4	0.41 \pm 0.05	58.70 \pm 2.77	21.17 \pm 1.20	360.8 \pm 13.0	15.15 \pm 0.87
	30	6.92 \pm 0.78	152.6 \pm 12.4	0.39 \pm 0.04	56.74 \pm 2.32	22.08 \pm 0.89	389.3 \pm 15.3	16.81 \pm 1.15
	40	7.91 \pm 2.04	170.1 \pm 41.24	0.44 \pm 0.12	54.82 \pm 2.83	21.54 \pm 0.62	393.6 \pm 20.9	16.52 \pm 0.99
IV	0	7.48 \pm 1.06	141.3 \pm 24.18	0.431 \pm 0.07	57.54 \pm 0.98	18.78 \pm 0.99	326.4 \pm 14.2	14.34 \pm 1.52
	10	8.20 \pm 0.83	155.7 \pm 16.74	0.462 \pm 0.05	56.33 \pm 1.62	18.97 \pm 1.02	336.7 \pm 15.4	14.52 \pm 2.15
	20	7.20 \pm 0.92	149.8 \pm 18.8	0.42 \pm 0.05	58.40 \pm 3.36	20.81 \pm 1.18	356.7 \pm 9.2	15.49 \pm 0.90
	30	7.53 \pm 1.27	163.9 \pm 23.5	0.43 \pm 0.06	56.68 \pm 2.85	21.83 \pm 1.26	385.1 \pm 16.9	16.77 \pm 1.13
	40	9.21 \pm 1.99	200.4 \pm 48.94	0.50 \pm 0.12	54.45 \pm 3.23	21.54 \pm 1.34	396.3 \pm 17.0	17.48 \pm 2.19
C	0	7.94 \pm 0.75	150.6 \pm 14.44	0.458 \pm 0.04	57.79 \pm 2.67	18.94 \pm 0.67	327.8 \pm 11.6	15.61 \pm 2.14
	10	7.58 \pm 1.28	140.8 \pm 20.68	0.434 \pm 0.07	57.32 \pm 2.66	18.61 \pm 1.29	325.3 \pm 22.7	15.07 \pm 2.15
	20	7.86 \pm 1.28	161.7 \pm 26.0	0.45 \pm 0.07	57.66 \pm 1.30	20.52 \pm 0.68	356.1 \pm 10.3	15.23 \pm 0.72
	30	7.57 \pm 0.82	163.1 \pm 20.6	0.40 \pm 0.06	52.41 \pm 3.51	21.49 \pm 0.77	407.6 \pm 31.9	16.71 \pm 1.14
	40	10.94 \pm 1.27	230.7 \pm 28.06	0.59 \pm 0.07	53.79 \pm 1.93	21.04 \pm 0.88	391.4 \pm 11.0	16.13 \pm 0.73

由表 5-4、5、6 可见, 喹胺醇对大鼠血液学的影响检查结果显示, 在整个灌药期间鼠各组之间 RBC、Hgb、WBC、LY、PLT、MO、GR 数量差异不显著, 各组内 RBC、Hgb、PLT、MO、GR 的数量在灌药的各个时间段也无显著性差异。

5.1.3 讨论

5.1.3.1 喹胺醇对大鼠体增重

雄性大鼠连续口服不同剂量的喹胺醇 40d 后, 结果显示剂量为 20mg/kg 体重和 10mg/kg 体重时, 该药的促生长效果较好, 20mg/kg 体重剂量下的体增重明显高于对照组($P<0.05$); 用同样剂量的喹胺醇连续处理雌鼠 40d 后, 结果发现, 剂量为 10mg/kg 体重时体增重明显高于对照组。喹胺醇对大鼠的促生长作用可能集中在试验的 15~25d 之间。张力等报道(张力, 2001), 饲料中添加 75mg/kg 喹胺醇后, 对断奶仔猪的促生长作用较好, 这与本研究结果相一致。同类药物如喹烯酮, 其合理的添加剂量亦在 50~70mg/kg, 与喹胺醇添加量接近(徐忠赞, 1995)。王玉莲等报道(王玉莲, 2005), 饲料中添加 50 或 100mg/kg 的喹赛多, 其抗菌促生长作用也较好, 该药也属于喹啉类药物。由此可见, 新型喹啉类药物添加的有效剂量在 50-100mg/kg 饲料为最佳。

5.1.3.2 喹胺醇对大鼠饲料消耗的影响

喹啉类兽用药物如喹乙醇、卡巴氧等的促生长机理可能与提高饲料利用率和转化率有关, 因此曾被广泛应用于饲料添加剂(曹随忠, 2001; 梁剑平, 2001)。本研究结果表明, 雌性大鼠连续口服 20、10mg/kg 体重的喹胺醇 40d, 饲料平均日消耗量低于其它三个剂量, 20mg/kg 体重时饲料消耗则更少($P<0.05$); 而雄鼠则是 10mg/kg 体重剂量组饲料消耗量较少。结合体增重结果, 分析认为该药在 100mg/kg 饲料量添加时, 药物的药效最好。

5.1.3.2 喹胺醇对组织形态学变化的影响

血细胞分析结果表明, 给试验大鼠连续口服剂量为 10~80mg/kg 体重的喹胺醇, 不会对血细胞在数量上产生明显不良影响, 在整个灌药期间各组间 RBC、Hgb、WBC、LY、PLT、MO、GR 水平差异不显著, 组内 RBC、Hgb、PLT、MO、GR 等的水平各个时间段亦无明显差异。大鼠连续用药 40d 后, 除肝脏系数各组间略有差别外, 其它脏器系数均无明显差异。虽然, 20mg/kg 体重组雌鼠肝脏系数略低于其它各组, 80mg/kg 体重组则略高于其它各组, 但差异不显著; 雄鼠肝脏系数与药物剂量间呈剂-效关系, 药物处理组肝脏指数均高于对照组。组织解剖学发现, 高剂量组有 1 例雌鼠子宫角肿大, 但卵巢色泽大小均正常; 1 例肝表面有出血点; 中剂量组 1 例雄鼠呈脂肪肝, 其它均未见任何肉眼组织学异常变化。镜检结果显示, 除上述肉眼可见的病例有组织形态学意义外, 其它试验鼠均没有任何明显组织病理学变化。分析认为, 上述个别病理变化与药物无关(张力, 2000)。

综上所述, 大鼠连续饲喂剂量为 10~80mg/kg 体重, 相当于饲料添加剂量 100~600mg/kg 饲料的喹胺醇后, 不会导致中毒现象; 饲料中添加 100~200mg/kg 饲料的喹胺醇, 其促生长作用和提高饲料利用率的效果最为理想。

5.2 喹胺醇对小鼠腹腔原代巨噬细胞 NO 及其酶的影响

5.2.1 材料和方法

5.2.1.1 试剂

RPMI-1640 培养基, 小牛血清, NO 及其酶测试盒 (南京建成生物工程研究所), 脂多糖(LPS), 硫乙醇酸钠, 二甲基亚砷(DMSO)。

5.2.1.2 试验药物、剂量及分组

试验药物喹胺醇由中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所新兽药工程实验室提供, 纯度 98.7%, 本实验室再行纯化, 纯度为 99.97%。将喹胺醇用二甲基亚砷配制成溶液, 分别按表 5-7 设计的药物剂量加入细胞体外培养介质中。

表 5-7 药物剂量 ($\mu\text{g/mL}$)
Table 5-7 Drug dose ($\mu\text{g/mL}$)

	空白对照 Blank C	I	II	III	IV	V	阳性对照 LPS
LPS	—	+	+	+	+	+	+
喹胺醇	—	800	400	200	100	50	—

注: “—”表示不加, “+”表示加。

5.2.1.3 试验动物、细胞提取、处理

10 只昆明种小白鼠, 体重 $23 \pm 3.0\text{g}$, 雌雄各半。在试验前, 每只小鼠腹腔注射 6.0% 的硫乙醇酸钠灭菌水溶液 1.0 mL。72h 后断颈处死, 分别用 2.0mL 的 RPMI-1640 培养基冲洗腹腔, 收集腹腔液, 1 000rpm 离心 5min。取含有 10% 小牛血清的培养基调整细胞数量为 1×10^6 个/mL 后, 分别加入 24 孔的培养板中, 每孔 1mL, 37°C 5%CO₂ 培养箱中温孵 2h。弃去培养液, 再用 10% 小牛血清的培养基冲洗未贴壁的细胞, 再加入培养基, 按上述浓度分别加入试验 25 μL 药物、加 20 μL LPS, 终体积 1mL。分别培养 0、6、12、24h,

5.2.1.4 NO 及其酶的检测

用南京建成试剂盒, 在 GBC Cintra-6 型分光光度计上检测。

5.2.1.5 数据分析

数据处理, 用 SSPS 11.0 对各组间均数进行 T-test 统计。

5.2.2 材料和方法

5.2.2.1 腹腔巨噬细胞 NO 含量变化

由表 5-8 可见, 0h 各组间在细胞培养液中 NO 的含量无明显差别。在培养液中加入 LPS 和喹胺醇培养 6h 后, 加药组 NO 的含量低于阳性对照 LPS 组和空白组, 且有显著性关系 ($P < 0.01$ or $P < 0.05$)。而空白组 NO 含量虽低于阳性对照组, 但无显著性统计学意义。从图 5-5 上可以看出, II 组的 NO 含量水平平均高于其它几个药物处理组。

表 5-8 小鼠腹腔巨噬细胞中 NO 含量
Table 5-8 NO content of celiac macrophage in mice

组别	Time(h)			
Group	0	6	12	24
I	412.8±17.34	438.97±20.04**	381.62±12.43**	334.56±47.47**
II	419.12±16.07	455.39±5.78**	439.21±37.44*	375.98±59.18**
III	424.41±7.30	437.25±10.89**	411.77±35.51**	363.72±63.28**
IV	407.11±51.24	398.53±29.23**	408.09±32.33**	341.42±42.48**
V	419.71±5.84	420.59±56.29*	379.9±14.33**	377.7±54.68**
Blank control	404.44±19.74	459.80±48.89	461.77±35.93	436.28±25.15
LPS	413.97±9.33	483.82±16.85	468.38±24.86	462.74±17.84

注：“*”表示与 LPS 阳性对照组相比 P<0.05；“**”表示与 LPS 阳性对照组相比 P<0.01，下表同。

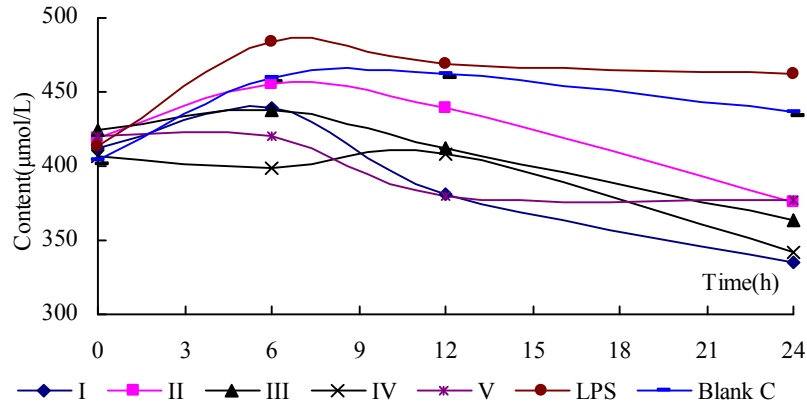


图 5-6 NO 含量随时间变化变化趋势
Fig. 5-6 Trend of NO content with time

5.2.2.2 腹腔巨噬细胞 NOS 酶水平

由表 5-9 可见，除 II 组外其它药物处理组和空白组 iNOS 活性均小于阳性对照 LPS 组，差异显著性各不相同。II 组 iNOS 活性在试验时点均高于其它几个药物处理组，6h 之前 II 组低于 LPS 组，6h 之后 II 组高于 LPS 组。24h 时 II 组 iNOS 活性显著高于其它几组 (P<0.05)。表 5-10 所示，各组 NOS 活性没有显著性差异。但从图 5-8 可见，LPS 组 NOS 活性在试验各时点均高于其它各组；药物处理组间没规律性变化。

表 5-9 小鼠腹腔巨噬细胞中 iNOS 活性
Table 5-9 iNOS activity of celiac macrophage in rats

组别	Time(h)			
Group	0	6	12	24
I	2.674±0.40*	2.644±0.76*	1.693±0.33	1.092±0.11
II	3.654±0.54	3.565±0.58	2.436±0.65	2.882±0.64
III	2.218±0.55*	3.208±1.23*	1.842±0.75	1.396±0.26
IV	3.327±0.69	2.703±0.44*	1.776±0.50	1.277±0.35
V	2.882±0.31*	3.149±0.63	1.307±0.24	1.456±0.19
Blank control	2.703±0.39	1.485±0.34	1.723±0.70	1.782±0.39
LPS	4.100±0.52	4.278±0.76	1.961±0.62	1.961±0.40

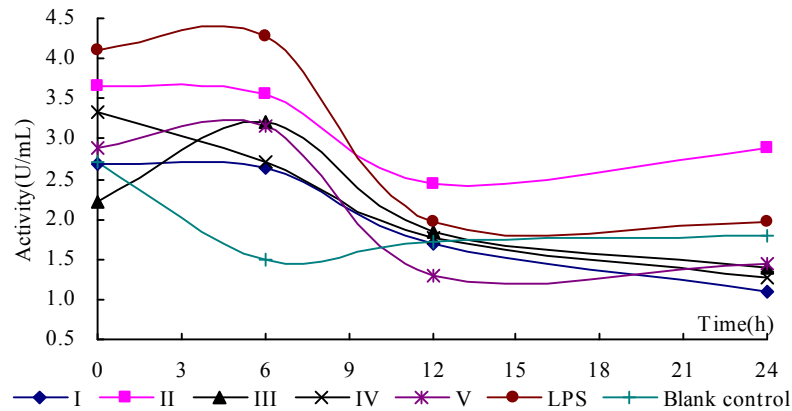


图 5-7 iNOS 活性随时间变化趋势
Fig. 5-7 Trend of iNOS activity with time

表 5-10 小鼠腹腔巨噬细胞中 NOS 活性
Table 5-10 NOS activity of celiac macrophage in mice

组别 Group	Time(h)			
	0	6	12	24
I	6.654±1.44	7.545±1.27	7.011±1.00	7.219±1.61
II	6.238±1.65	7.754±0.36	6.595±1.74	6.743±2.19
III	7.457±0.57	6.832±0.14	6.327±2.31	6.179±1.77
IV	7.278±2.31	5.912±1.25	8.140±1.29	7.367±1.43
V	7.100±0.8	7.249±1.28	7.753±0.67	6.684±2.06
Blank control	5.436±1.33	7.160±0.74	7.813±2.33	6.536±2.29
LPS	7.516±2.29	8.466±0.49	9.209±1.73	6.476±1.87

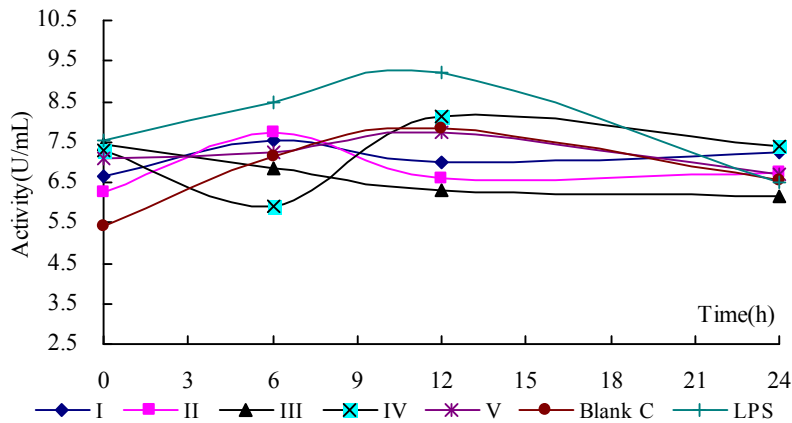


图 5-8 NOS 活性随时间变化趋势
Fig. 5-8 Trend of NOS activity with time

5.2.2.2 喹胺醇浓度与 NO、NOS 间的相关性

由表 5-11 可见，6h 时培养基中药物浓度与 NO 含量、iNOS 活性呈正相关性，与 NOS 呈相关性；0h 时各指标间均呈负相关性；12 和 24h 时有正也有负相关性，无规律性关系。

表 5-11 药物浓度与 NO 含量、NOS 和 iNOS 活性间相关性
Table 5-11 Correlation between drug concentration and NO content, NOS
and iNOS activity in culture medium

	Time(h)			
	0	6	12	24
NO 含量				
NO content	-0.1594	0.5684	-0.1086	-0.5028
NOS 活性				
NOS activity	-0.0774	-0.2633	0.2691	-0.0066
iNOS 活性				
iNOS activity	-0.6169	0.5820	-0.4197	0.3117

5.2.3 讨论

自美国科学家发现一氧化氮 (Nitric oxide, NO) 是心血管系统中一种重要的生物信号递质以来, 它的各种生物学作用就成为人们研究的热点, 1992 年《Nature》杂志将 NO 评为明星分子, 1998 年 Robert F. Furchgott、Louis J. Ignarro、Ferid Murad 三位科学家因此而获得了医学生理学诺贝尔奖 (Shampo MA,2004)。机体内的 NO 是在一氧化氮合酶 (NO synthase, NOS) 的催化作用下, 由 L-精氨酸(L-Arg)转变为 L-瓜氨酸 (L-Cit) 的过程中产生的, 随即被扩散到周围组织中, 并发挥生物学作用(Murad F.2004)。机体内 NO 的水平一般维持在一个平衡状态, 虽然有大量的 NO 在体内生成, 但是由于其生物半衰期很短, 仅有 5-6s 的时间, 因此很容易被氧化成 NO₂, 然后以硝酸根 (NO₃⁻) 和亚硝酸根(NO₂⁻)离子的形式存在于细胞内外液中。目前认为, NO 的生物学作用有三个方面: 一是细胞毒作用, 即当细菌、病毒或肿瘤细胞产生后, 会刺激机体内巨噬细胞产生大量的 NO, NO 会转变成自由基 ONOO, 该物质进入微生物或肿瘤细胞, 可与 DNA 结合或抑制 DNA 合成酶, 从而杀死病原微生物或肿瘤细胞; 二是神经递质作用, NO 作为一种生物信使物质, 在信号传导过程中有重要作用, 研究认为大脑的许多部位都有产生 NO 的能力, Moncada 等提出 NO 在哺乳动物的消化、生殖、呼吸、循环等系统的自主调节过程中有重要作用, 如嗅觉、痛觉等的信号传递就有 NO 的参与。近年来研究还发现, 成年动物体内的 NO 在兴奋性氨基酸引起的短期突触性效应和神经发育、学习、记忆等长期效应中也有重要作用; 三是心血管调节因子, Bian K 等 (Bian K,2003) 报道, 血管平滑肌的舒张需要鸟苷环化酶(guanylatecyclase, GC)的活化, 从而使鸟苷(GTP)转化为环化的单磷酸鸟苷[cyclicguanosine(3',5')-monophosphate, cGMP], NO 是 GC 活化的活性介质; Fiscus 等 (RR.2002) 在研究乙酰胆碱对血管平滑肌的舒张作用时, 发现 NO 作为一种“第二信使”在其中起着关键作用, 当时称之为“内皮舒张因子”(EDRF), 后来很多实验证实 EDRF 就是 NO。研究发现, NO 能够促进血管平滑肌松弛, 并可抑制血小板凝集和黏附于内皮细胞, 从而调节血压。

催化和调节机体内 NO 生物合成的酶有三类 (Videla S,2006): 神经型 NOS (nNOS)、内皮型 (eNOS) 和诱导型(iNOS), 这三种酶分别存在于神经、血管内皮和免疫细胞如巨噬细胞等组织中, 在体内外的许多因素刺激下, 会导致这三种酶的表达, 从而产生大量的 NO, 并在维持细胞内环境中发挥重要作用。随着人们对 NO 生物学研究的深入, 其免疫调节作用及其机理的研究也越来越深入, 因此 NO 也可以被认为是一种免疫分子, 在机体的非特异性免疫中扮演重要角色。机体的免疫系统中, 许多细胞的活动与 NO 有关, 如 Th1/Th2、中性粒细胞和巨噬细胞等 (Gattoni A, 2006)。研究认为, 当抗原、细菌或病毒等进入机体后, 诱导 NOS 酶的表达, 导致巨噬细胞内

产生大量 NO，从而在细菌的杀灭和病毒破坏中发挥作用。试验发现，脾脏培养液中加入脂多糖 LPS 后，检测发现 NO 的含量有显著性升高作用，因此在许多研究中用 LPS 作为 NO 的诱导剂使用 (Sarkar S, 2006)。由此可见，研究外源性物质对机体内 NO 和 NOS 的影响，对阐述药物或毒物的药理或毒理学作用，评价药物对机体免疫机能影响具有重要意义。

本实验利用小鼠腹腔巨噬细胞的体外培养，研究了喹胺醇对这类细胞 NO 和 NOS 活性的影响。结果显示，当在体外细胞培养介质中加入 LPS 后，有明显刺激 NO 生成和诱导 iNOS 活性的作用。当在细胞的培养基中同时加入 LPS 和不同浓度的喹胺醇的二甲基亚砜 (DMSO) 溶液后，不同时间、不同浓度处理后 NO 和 NOS 水平各有不同。在上述两种物质加入细胞培养基后的 0h 时，NO 和总 NOS 各组间没有明显差别，但 iNOS 的活性在 LPS 组明显高于其它几组，这说明 LPS 对 iNOS 活性的诱导作用很快。当加入药液培养 6h 后，药物处理组 NO 的含量则低于阳性对照 LPS 组和空白对照组，且有显著性关系 ($P<0.05$)，空白对照组的 NO 含量虽低于 LPS 阳性对照组，但无显著性统计学意义。从药物的作用浓度对 NO 生成的影响结果看，当培养基中药物的浓度为 $400\mu\text{g/mL}$ 时，无论是 NO 的含量、还是 iNOS 活性，均比其它几个药物浓度组高。总 NOS 酶的变化仍然是 LPS 高于其它各组，而其它各组间该酶活性的变化无规律性。

综上所述，喹胺醇对 LPS 诱导的体外培养小鼠腹腔巨噬细胞产生 NO 水平有下调作用，一方面与 NO 的生成抑制有关，一方面可能会导致 NO 迅速降解；当喹胺醇在一定剂量 ($400\mu\text{g/mL}$) 时对 iNOS 的活性有正调节作用，高于或低于该剂量则呈现负调节作用。

5.3 喹胺醇对小鼠细胞免疫活性因子水平的影响

5.3.1 材料和方法

5.3.1.1 试验动物

昆明种小白鼠 100 只，体重 $23\pm 3.0\text{g}$ ，雌雄各半，随机分为 5 组，分别为高剂量组 (I)、较高剂量组 (II)、中剂量组 (III)、低剂量组 (IV) 和对照组 (C)，每组 20 只。试验饲料为小鼠常规颗粒粮，自由采食、自由饮水。

5.3.1.2 试验药品

试验药品喹胺醇由中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究新兽药工程实验室提供，纯度 98.7%，本实验室再行纯化，纯度为 99.97%。将喹胺醇配制混悬水溶液，分别按表 5-12 设计的药物剂量，每天给试验鼠灌胃，连续用药 14d。

表 5-12 药物剂量 (mg/kg.diet)
Table 5-12 Drug dose (mg/kg.diet)

	I	II	III	IV	对照组
LD ₅₀	LD ₅₀ /10	LD ₅₀ /25	LD ₅₀ /50	LD ₅₀ /100	
Additive dose	3158.35	1263.33	631.67	105.56	0.9% NaCl

5.3.1.3 试验设计

分别在试验的 7d 和 14d，摘眼球采血，分离血清，-20 冰冻保存，供细胞因子的检测。

5.2.1.4 检测指标

分别按上述设计时间,检测血清中 TNF、IL-2 和 IL-6 水平。均用解放军总医院科技开发中心放免所检测试剂盒法测定。

5.2.1.5 数据处理

数据处理,用 SPSS 11.0 对各组间均数进行 T-test 统计。

5.3.2 结果

5.3.2.1 喹胺醇 TNF 的影响

由表 5-13 可见,连续口服喹胺醇 7d 和 14d 时,III 组雄鼠血清中 TNF 浓度极显著高于对照组 (C) ($P<0.01$),且显著高于其它三组 ($P<0.05$)。

雌鼠仅在第 7d 时 IV 组鼠血清中 TNF 显著高于对照组和其它几组 ($P<0.05$),14d 时虽高于对照组但不显著。如图 5-9、10 所示,7d 时随给药剂量的增加 TNF 水平呈下降趋势,但 14d 时未观察到这种变化趋势。

表 5-13 给药后血清 TNF 浓度

Table 5-13 TNF concentration in serum after oral administration *kuianchun*

		I	II	III	IV	C
雄	7d	1.240 ± 0.31	1.450 ± 0.73	2.420 ± 0.65**	1.994 ± 0.69	1.670 ± 0.66
Male	14d	1.536 ± 0.52	1.422 ± 0.58	2.580 ± 1.39**	1.904 ± 0.69	1.713 ± 0.62
雌	7d	1.720 ± 0.68	1.976 ± 0.55	1.852 ± 0.44	2.698 ± 0.97*	2.135 ± 0.82
Female	14d	1.052 ± 0.42	1.602 ± 0.49	1.383 ± 0.44	1.795 ± 0.49	1.518 ± 0.61

注: “*”表示与对照组比 $P<0.05$; “**”与对照组 $P<0.01$, 下表同。

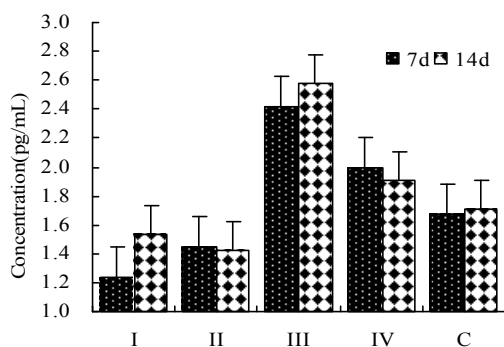


图 5-9 雄鼠 7d 和 14d 血 TNF 含量差异
Fig. 5-9 Difference of TNF concentration between 7d and 14d in male rats

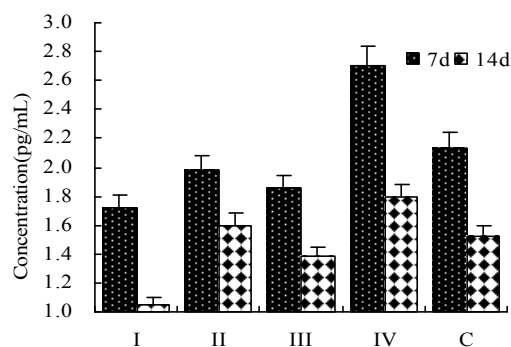


图 5-10 雌鼠 7d 和 14d 血 TNF 含量差异
Fig. 5-10 Difference of TNF concentration between 7d and 14d in female rats

5.3.2.2 喹胺醇 IL-2 的影响

由表 5-14 所示,试验期内雄鼠血清 IL-2 浓度各组间没有明显差异,但是 14d 时 IL-2 浓度均显著高于 7d。

雌鼠 7d 时 I 和 III 组 IL-2 显著低于对照组和其它几组 ($P<0.05$),14d 时 II 和 III 组血清 IL-2 极显著低于对照组 ($P<0.01$)、显著低于其它二药物组 ($P<0.05$)。

表 5-14 给药后血清 IL-2 浓度

Table 5-14 IL-2 concentration in serum after oral administration *kuianchun*

		I	II	III	IV	C
雄	7d	3.430±0.48	3.470 ±1.19	3.420 ±1.60	3.152 ±1.16	3.398 ±1.39
Male	14d	4.570±1.72	5.092±0.69	4.615±1.09	4.872±1.26	4.400±1.23
雌	7d	3.180 ±0.54*	4.308 ±1.82	3.520 ±0.86*	4.380 ±1.55	4.648 ±2.48
Female	14d	3.622 ±1.43	2.678 ±0.72**	2.980 ±0.13**	4.080 ±1.61	4.462 ±1.53

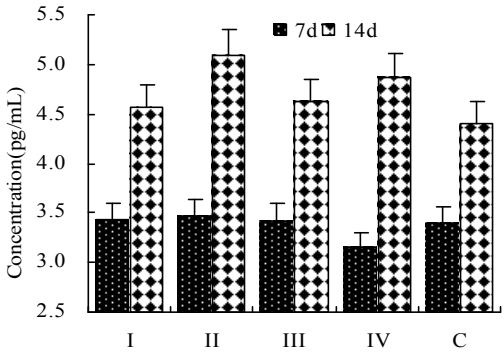


图 5-11 雄鼠 7d 和 14d 血 IL-2 含量差异
Fig. 5-11 Difference of IL-2 concentration between 7d and 14d in male rats

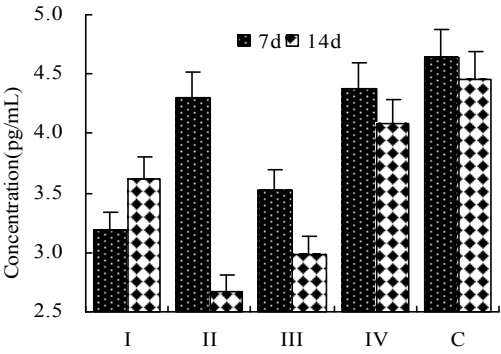


图 5-12 雌鼠 7d 和 14d 血 IL-2 含量差异
Fig. 5-12 Difference of IL-2 concentration between 7d and 14d in female rats

5.3.2.3 喹胺醇对 IL-6 的影响

表 5-15 给药后血清 IL-6 浓度

Table 5-15 IL-6 concentration in serum after oral administration *kuianchun*

		I	II	III	IV	C
雄	7d	62.70±16.84	101.96±15.58*	171.70±35.63**	132.03±32.74*	86.05±20.97
Male	14d	105.87±13.91	171.95±13.97**	174.30±16.83**	116.07±20.75	113.02±27.09
雌	7d	65.45 ±8.51*	87.92 ±12.72*	83.01 ±13.82*	104.28 ±25.61	123.43 ±13.91
Female	14d	85.11 ±11.76	103.93 ±26.99	98.19 ±11.59	168.25 ±34.31**	98.69 ±8.02

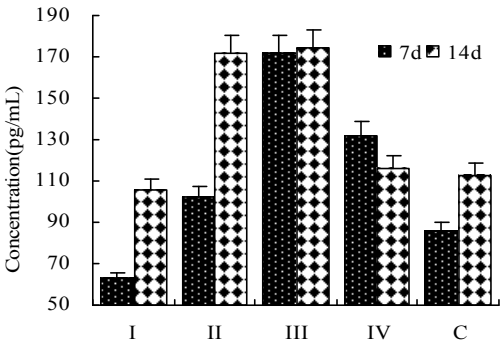


图 5-13 雄鼠 7d 和 14d 血 IL-6 含量差异
Fig. 5-13 Difference of IL-2 concentration between 7d and 14d in male rats

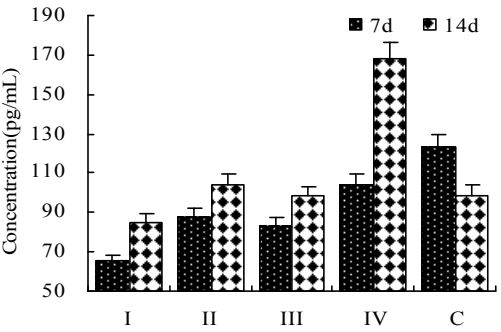


图 5-14 雌鼠 7d 和 14d 血 IL-6 含量差异
Fig. 5-14 Difference of IL-2 concentration between 7d and 14d in male rats

表 5-15 所示，7d 时 III 组血清 IL-6 浓度极显著高于对照组和 I 组 ($P<0.01$)、II 组和 IV 组显著高于对照组和 I 组 ($P<0.05$)；14d 时 II 组和 III 组极显著高于对照组和其它二药物处理组；14d

时 I、II 组 IL-6 显著高于 7d ($P<0.05$)。

7d 时雌鼠 I、II、III 组血清 IL-6 显著低于对照组 ($P<0.05$)，亦低于 IV 组，但无统计学意义；14d 时 IV 组极显著高于对照组和其它三组 ($P<0.01$)；14d 时各组 IL-6 浓度高于 7d。

5.3.2.4 给药剂量与细胞因子间的相关性

表 5-16 所示，连续给药 7 和 14d 时，给药剂量与血清细胞因子 TNF、IL-6 的浓度均呈负相关性，与血清 IL-2 的浓度间除雄鼠 7d 时，其它时间也呈负相关性。

表 5-16 药物剂量与血清细胞因子浓度间相关系数

Table 5-16 Correlation coefficient between drug dose and cytokines concentration in serum

Cytokine	Sex	Time(d)	
		7	14
TNF	雄	-0.7844	-0.5367
	雌	-0.7164	-0.8728
IL-2	雄	0.5750	-0.4130
	雌	-0.7085	-0.0376
IL-6	雄	-0.8391	-0.9098
	雌	-0.4074	-0.7252

5.3.2 讨论

细胞因子 (cytokine) 是机体免疫细胞或非免疫细胞合成或分泌的具有生物活性的小分子多肽或糖蛋白的总称。淋巴细胞产生的细胞因子称为淋巴因子；单核细胞产生的细胞因子称为单核细胞因子；纤维细胞或内皮细胞产生的可刺激骨髓干细胞或祖细胞分化成熟的细胞因子叫集落刺激因子 (colony stimulating factor, CSF)。细胞因子参与机体的多种生理活动的调节，调节免疫，参与细胞间的互相作用，调节细胞的生长和分化等(金伯泉,2001)。研究细胞因子有助于阐明分子水平的免疫调节机制，有助于疾病的预防、诊断和治疗，特别是利用细胞因子治疗肿瘤、感染、造血功能障碍、自身免疫病等，已收到初步疗效，具有非常广阔的应用前景。目前，已知的细胞因子有多种，其在免疫调节过程发挥的作用也各不相同。

肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)是一类能直接造成肿瘤细胞死亡或凋亡的细胞因子，而对机体其它细胞几乎无毒性作用。根据其来源和结构分为两种，即 TNF- α 和 TNF- β ，前者由单核巨噬细胞产生(Laird SM,2003)；后者由活化的 T 细胞产生，又名淋巴毒素(lymphotoxin)。TNF- α 是一种多功能细胞因子，具有广泛的生物学特性，其最显著的活性特征是在体内外特异性地杀伤肿瘤细胞，而对正常细胞无明显毒性作用。白细胞介素 2 (interleukin-2, IL-2) 是由 CD4⁺T 细胞产生，CD8⁺T 细胞也可产生，其生物学作用是活化 CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞，促进其它细胞因子的产生，还能够刺激 NK 细胞增殖、活化，诱导 LAK 细胞的产生，对 B 细胞活化、增殖、抗体的产生有积极作用，还能激活单核-巨噬细胞(Keller C,2003)。白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 主要由 Th2 细胞产生，也可由单核-巨噬细胞、血管内皮细胞、成纤维细胞产生，其生物学功能主要有刺激肝细胞合成急性期血浆蛋白，参与炎症反应；刺激活化 B 细胞的增殖，分泌抗体；协同刺激 T 细胞、胸腺细胞和骨髓造血干细胞增殖；促骨髓瘤细胞增殖等(Nicholas J, 1999; Eric Jüttler,2002)。可见这三种细胞因子在机体的免疫调节中，有重要作用。

在外源性或内源物质、病原微生物入侵、病理或异常生理过程中, 细胞因子可能会产生诱导或抑制作用。喹胺醇属 quinoxaline-1, 4-dioxide 结构衍生物, 是一种新型的抗菌促生长药物性添加剂。近年来就添加剂对免疫机能的影响研究较多, 但集中在多肽类、酶制剂和中药添加剂等方面, 而药物性添加剂尤其喹啉类(如喹乙醇等)对机体免疫机能的影响研究相对较少。本实验通过给小鼠连续口服喹胺醇后, 检测不同时点血清中细胞因子 TNF、IL-2 和 IL-6 的水平, 评估了该药对这几种细胞因子的影响。

结果显示, 连续口服喹胺醇 7d 和 14d 时, 631.67mg/kg 饲料组雄鼠血清 TNF 浓度极显著高于未给药组 ($P<0.01$), 也高于其它三个药物剂量组; 雌鼠 105.56mg/kg 饲料组显著高于对照组 ($P<0.05$), 也高于其它三药物组, 14d 时也高于其它几组, 但不显著(见表 5-15、图 5-9 和 10); 给药剂量与 TNF 水平间呈负相关关系, 但不显著。这表明, 当雄鼠喹胺醇的给药剂量高于 631.67mg/kg 饲料时, 对 TNF 有抑制作用, 低于该剂量时可能对 TNF 有诱导作用。雌鼠血清 TNF 则是 105.56mg/kg 饲料剂量组高于对照组和其它三个药物处理组, 随剂量的增加该因子亦呈下降趋势, 表明该药对雌鼠 TNF 的抑制作用当高于 105.56mg/kg 饲料剂量时会增大。

血清中 IL-2 的变化与 TNF 不同, 雄鼠在试验的 7 和 14d 各组间均无明显差别, 但相关性分析结果显示, 给药剂量与 IL-2 间仍称负相关关系。喹胺醇对雌鼠 IL-2 的影响比雄鼠明显, 当给药剂量为 1263.35 和 631.33mg/kg 饲料时, 血清 IL-2 低于对照组和其它二个药物组。由此结果推测, 喹胺醇对雄鼠 IL-2 的基本无影响, 但当雌鼠的给药剂量在 1263.35~631.33mg/kg 饲料之间时, 可能对 IL-2 有抑制作用, 如果给药高于或低于该剂量时, 则对 IL-2 的影响会减弱(见表 5-14、图 5-11 和 12)。

血清中 IL-6 浓度, 7d 时雄鼠 631.67mg/kg 体重组极显著高于对照组 ($P<0.01$), 105.56 和 1263.33mg/kg 饲料组显著高于对照组 ($P<0.05$); 14d 时 631.67 和 1263.33mg/kg 饲料组血清 IL-6 极显著高于对照组 ($P<0.01$)。雌鼠则是 631.67mg/kg 饲料以上剂量组显著低于对照组, 14d 时 105.56mg/kg 饲料剂量组极显著高于对照组 ($P<0.01$), 其它几个剂量组与对照组间无任何明显的差别。如表 5-16 所示, 给药剂量与血清 IL-6 浓度间均呈负相关关系。该结果表明, 喹胺醇可能在小于 1263.33mg/kg 饲料剂量时, 雄鼠连续口服后对 IL-6 有促进作用, 如果给药剂量再大则可能有抑制作用。雌鼠 IL-6 则是随给药剂量的增加呈下降趋势, 但药物剂量在 105.56mg/kg 饲料时对雌鼠 IL-6 也有促进作用。

综上所述, 小鼠连续口服喹胺醇后, 对血清中细胞因子 TNF、IL-2 和 IL-6 的影响存在性别差异和剂量差异。雄鼠给药剂量低于 631.67mg/kg 饲料以下, 雌鼠给药剂量低于 105.56mg/kg 饲料时, 对机体内 TNF 有促进作用, 剂量再高则呈相反的结果; 喹胺醇可能对雄鼠机体 IL-2 没有影响, 但对雌鼠 IL-2 有抑制作用; 给药剂量低于 1263.33mg/kg 饲料时, 喹胺醇对雄鼠 IL-6 有促进作用, 雌鼠则可能低于 105.56mg/kg 饲料剂量时对 IL-6 才有促进作用。

第六章 结 论

6.1 喹胺醇药代动力学与排泄研究

猪单次口服高剂量的喹胺醇后,药代动力学数学模型符合一级一室开放模型;单次静脉注射低剂量的喹胺醇后,药代动力学数学模型符合典型的二室模型;鸡连续口服喹胺醇后药代动力学数学模型符合一级二室开放模型。

喹胺醇在靶动物体内的吸收、分布均相对较快,但大剂量口服或连续给药后其消除速率较慢;喹胺醇的生物利用度相对较低,如能改进剂型,效果可能会更好;喹胺醇在靶动物体内主要以原药的形式经肠道随粪便排出体外,以原药的形式从尿中的排泄率很低。

实验所选测试条件即波长、流动相、固定相等可以做为喹胺醇标准制定时的检测方法,但样品的前期处理方法还需改进和完善。

6.2 喹胺醇对肝细胞色素 P450 及其亚型基因表达和同工酶活性影响

喹胺醇对雄性大鼠肝细胞色素 P450 有抑制作用,对雌性大鼠细胞色素 P450 低剂量有诱导作用、高剂量有抑制作用;对雄鼠肝细胞色素 b5 则有诱导作用,对雌鼠细胞色素 b5 在低剂量有抑制作用、高剂量有诱导作用;低剂量喹胺醇对大鼠肝 GST 具有诱导作用,而高剂量则有抑制作用。

连续口服喹胺醇对大鼠肝 CYP450 同工酶 EROD 有诱导作用,与给药剂量间呈负相关;对 EMND、APND 有抑制作用,与给药剂量间呈正相关。

低剂量喹胺醇对大鼠肝 CYP450 亚型 CYP3A1 mRNA 有上调作用,高剂量则会导致其基因表达水平下降,低剂量时可能只作用于蛋白水平,高剂量时会影响到 mRNA 水平;高剂量喹胺醇对肝 CYP2E1 mRNA 和 CYP1A1 mRNA 均有下调作用。

6.3 喹胺醇对机体自由基代谢的影响

单剂量口服或静脉注射喹胺醇后,短时间内有导致机体抗氧化机能紊乱的可能,但随着药物在机体内的代谢和机体自身的调节,抗氧化机能会逐渐恢复正常。因此,单次给药不会导致机体发生氧应激性损伤。

连续口服给药时,喹胺醇会导致机体抗氧化机能紊乱,脂质过氧化反应明显,自由基水平会明显升高,而机体的抗氧化力则被抑制。但停药 10d 后,随抗氧化机能的恢复,脂质过氧化反应会明显减轻,甚至观察不到脂质过氧反应的发生。

由于喹胺醇在畜禽组织内残留量小,因此在实际生产中,只要严格遵循药物的添加剂量、严格遵守休药期,均不会对人类自由基代谢和抗氧化机能产生不良影响。

6.4 喹胺醇对细胞免疫活性因子和组织学影响

正常添加剂量的喹胺醇不会对试验动物的血细胞和淋巴细胞在数量上产生不良影响,高于正常添加量 8 倍后,也不会导致试验动物发生明显的病理组织形态学变化。

喹胺醇对 LPS 诱导的体外培养小鼠腹腔巨噬细胞产生 NO 水平有下调作用，一方面与 NO 的生成抑制有关，一方面可能会导致 NO 迅速降解；当喹胺醇在一定剂量（400 μ g/mL）时对 iNOS 的活性有正调节作用，高于或低于该剂量则呈现负调节作用。

当给药量小于 631.67mg/kg.饲料时，对细胞因子 TNF、IL-6 有诱导作用，但对 IL-2 无明显影响，且存在性别差异。

6.5 潜在毒性评价

喹胺醇作为一种新型兽用抗菌促生长类药物性饲料添加剂，在临床使用过程，如严格遵循添加量、休药期和靶动物，均不会对消费者造成潜在毒性作用。

参考文献:

- [1] 艾晓辉, 陈正望, 张春光, 等. 喹乙醇在鲤鱼体内的药物代谢动力学及组织浓度[J]. 水生生物学报, 2003, 3: 10-13
- [2] 曹随忠, 张 力, 梁剑平, 等. 喹啉-1, 4-二氧化物类抗菌促生长剂特殊毒理学研究进展[J]. 动物医学进展, 2001, 22(2): 17~20.
- [3] 曹香林, 杨志强, 梁剑平, 等. 喹胺醇在鸡组织的消除及残留研究[J]. 中兽医医药杂志, 2004, 3: 5~8
- [4] 车业贵, 余四九, 杨志强, 等. 喹胺醇对雌鼠生殖内分泌的影响研究[J]. 中兽医医药杂志, 2006, 3: 17-19
- [5] 陈 瑗, 周 玫. 自由基医学[M]. 人民军医出版社. 第一版, 1991, 北京.
- [6] 陈 瑗, 周 玫. 自由基医学基础与病理生理[M]. 人民卫生出版社. 第一版, 2002, 北京.
- [7] 陈贵才, 底桂芳, 王丽, 等. 我国兽药新剂量的研究与应用[J]. 中国家禽, 2005, 28(9): 34~38
- [8] 陈章锐, 夏文江. MCPKP 自动化药物动力学微机程度软件及其应用[J]. 内部资料, 1987
- [9] 陈杖榴. 兽医药理学[M], 中国农业出版社, 2nd, 北京, 2004
- [10] 邓树海. 药代动力学与生物药剂学[M]. 天津科技翻译出版社, 1992, 第一版
- [11] 方允中, 李文杰. 自由基与酶[M]. 科学出版社, 第一版, 1989, 北京.
- [12] 方允中. 从生命科学到自由基生命科学的求索[J]. 自由基生命科学进展, 1998, 6: 1-14
- [13] 冯洪辉. 兽医药物代谢动力学[M]. 科学技术出版社, 1987
- [14] 何祖健. 复方痢菌净注射液体外抑菌和临床治疗试验[J]. 广西畜牧兽医, 2001, 17(6): 9~17
- [15] 黄玲利, 袁宗辉, 范盛先, 等. 喹赛多对家禽常见病原菌的体外抗菌活性研究[J]. 华南农业大学学报(自然科学版), 2003, 24(2): 81~83 .
- [16] 金伯泉. 细胞和分子免疫学[M]. 科学出版社, 2nd, 北京, 2001
- [17] 金念祖, 陆晓和. 食物、细胞色素 P450 酶与药物代谢[J]. 药学进展, 1995, 19(4): 220-222
- [18] 鞠美华, 李 燕. 细胞色素 P450 同工酶在外源物代谢中的作用[J]. 国外医学药学分册 1998, 25(4): 218-224
- [19] 冷欣夫, 邱星辉. 细胞色素 P450 酶系的结构、功能与应用前景[M]. 科学出版社, 第一版, 北京, 2001.
- [20] 李建晴, 董川, 冯小花. 四种喹诺酮类药物滤纸基质室温磷光法研究[J]. 分析化学研究简报, 2002, 30 (6): 716-768
- [21] 李建喜, 杨志强, 王学智. 自由基在动物机体内的生物学作用[J]. 动物医学进展, 2006, 27(10): 33~35
- [22] 李剑勇, 李金善, 徐忠赞, 等. 高效液相色谱仪检测鸡组织器官喹烯酮残留方法的建立[J]. 动物医学进展, 2004, 25(5): 100-101
- [23] 李剑勇, 赵荣材, 李金善, 等. 喹烯酮在猪体内的药代动力学研究[J]. 中国兽医科技. 2001, 31(8): 31~33
- [24] 梁剑平, 张力, 曹随中, 等. 新型饲料添加剂喹胺醇的致突变性及其潜在致癌性预测[J]. 中国农业科学, 2001, 24(6): 679~685
- [25] 刘聚祥, 王 中. 我国兽药研究现状与思考[J]. 兽药与饲料添加剂, 2001, 6(3): 31-32
- [26] 刘维华, 晁向阳, 蒋安文, 等. 从部分兽药残留检测状况浅谈畜产品质量安全[J]. 中国兽药杂志, 2006, 40(5): 48~51
- [27] 刘兆红, 岳炳辉. 氧自由基对动物机体的毒性作用[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2005, 3: 57~59
- [28] 刘兆颖. 肝药酶在喹乙醇代谢中的作用研究[J]. 中国畜牧兽医学会兽医药理毒理学会学术论文集, 2006, P: 110-115
- [29] 柳晓泉, 王广基, 钱之玉. 细胞色素 P450 酶在药物代谢及开发研究中的应用[J]. 药学进展, 2000, 24(6): 334-338
- [30] 庞莉萍, 崔景荣. 细胞色素 P450 1A1 的研究进展[J]. 国外医学遗传学分册, 2005, 28(2): 80 -84
- [31] 邱银生, 袁宗辉, 范盛先, 等. 高效液相色谱法测定猪血浆及组织中喹赛多及其脱二氧代谢物[J]. 中国兽医学报, 2003, 23(4): 363-365
- [32] 邱银生, 袁宗辉, 殷居易. 猪食用组织中喹啉-2-羧酸的高效液相色谱检测方法[J]. 中国兽医学报 2003, 23(3): 286-289
- [33] 孙 雷, 杨贵香. 兽用微生物药物免疫调节作用的研究进展[J]. 畜牧与兽医, 2003, 35(2): 38~40
- [34] 孙永学, 冯洪辉, 董滴波, 等. 喹乙醇在鸡体内的毒物动力学及其生化毒性和病理学研究: 喹乙醇在鸡体内的毒物动力学研究[J]. 畜牧兽医学报, 1998, 29 (5), 385~391
- [35] 唐跃年, 张顺国, 李 岚, 等. 肝细胞微粒体的制备和细胞色素 P450 氧化酶活性测定[J]. 中国医院药学杂志, 1998, 18(12): 535-537

- [36] 汪德清, 沈文梅, 田亚平. 自由基对生物大分子损伤及防护的研究进展[J]. 自由基生命科学进展, 北京原子出版社, No2, pp:31, 1994
- [37] 王广基. 药物代谢动力学[M]. 化学工业出版社, 第一版, 北京, 2005
- [38] 王玉莲, 袁宗辉, 朱惠玲, 等. 喹赛多对断奶仔猪的生长性能和胴体品质的影响. 华中农业大学学报, 2005, 1: 17-21
- [39] 夏世钧, 吴中亮. 分子毒理学基础[M]. 湖北科学技术出版社. 第一版, 2001
- [40] 辛华雯, 吴笑春, 李 磐, 等. 盐酸小檗碱与环孢素 A 合用对大鼠肝 P450 同工酶和 *mdr1* 的影响[J]. 中国药理学通报, 2002, 18 (4): 397-401
- [41] 徐士新. 我国新兽药开发现状及存在问题[J]. 中国家禽, 2001, 23(22): 4~8
- [42] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 第三版. 北京: 人民卫生出版社, 2001, 511-515.
- [43] 徐忠赞, 李金善, 赵荣材, 等. 饲料添加新药喹烯酮对仔猪的增重试验[J]. 中国兽医科技, 1995, 6(25): 37-39.
- [44] 许华夏, 李培军, 刘宛, 等. 生物细胞色素 P450 的研究进展[J]. 农业环境保护, 2002, 21(2): 188-191
- [45] 余爱荣, 辛华雯, 吴笑春, 等. 环孢素与小檗碱合用抑制肝 CYP3A1、CYP2E1、*mdr1* 基因表达的实验研究[J]. 医药导报, 2004, 23(1): 366-369
- [46] 袁群英. 紫外分光光度法测定乙酰甲嗪的含量[J]. 中国兽药杂志, 1996, 30(4): 30~31
- [47] 曾振灵, 董漓波, 陈杖榴. 喹乙醇在鸡组织的消除及残留研究[J]. 畜牧兽医学报, 1995, 26(4): 327~333
- [48] 张 力, 梁剑平, 程富胜, 等. 喹胺醇对断奶仔猪的亚急性毒性试验[J]. 中兽医医药杂志, 2001, 20(2): 11~12
- [49] 张 力, 梁剑平, 周丽霞, 等. 喹胺醇对肉用仔鸡亚急性毒性试验[J]. 中国兽医科技, 2001, 31(1): 27-30.
- [50] 张 力, 周丽霞, 梁剑平, 等. 喹胺醇 1 号和 3 号体外抑菌试验[J]. 中国兽医科技, 1998, 28(7): 24~25
- [51] 张 力, 梁剑平, 袁莉刚, 等. 喹胺醇饲喂肉仔鸡急性毒性试验及病理形态学研究[J]. 中兽医医药杂志, 2000, 6: 6~8
- [52] 张丰景. 断奶仔猪料中添加剂痢菌净试验[J]. 上海畜牧兽医通讯, 1998, 1: 17~18
- [53] 张宏伟, 王 喆, 刘 伟. 动物源性食品中兽药和饲料添加剂残留及其对人体的危害[J]. 兽药与饲料添加剂, 2004, 9(4): 1~3
- [54] 张丽芳, 薛飞群, 刘元元, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定鸡组织中的喹烯酮标示残留物[J]. 分析测试学报, 2006, 5: 32-33
- [55] 张治平. 抗生素与抗菌药发展史[J]. 首都医药. 2004. 1: 37
- [56] 张治平. 抗生素与抗菌药发展史[J]. 首都医药. 2004. 2: 14~16
- [57] 赵克然, 杨毅军, 曹道俊. 氧自由基与临床[M]. 北京: 中国医药科技大学出版社, 2000: 1-56
- [58] 赵世民. 医学自由基基础与临床[M], 山东大学出版社, 1993, 1st, 山东
- [59] 郑荣梁, 黄中洋. 自由基医学与农学基础[M]. 高等教育出版社, 第一版, 2001, 北京.
- [60] 周丽霞, 张力, 梁剑平, 等. 喹胺醇对小白鼠的抗感染试验[J]. 中国兽医科技, 1998, 29 (2): 39-40
- [61] 周丽霞, 张力, 梁剑平, 等. 喹胺醇在难体内的残留分析[J]. 中国预防兽医学报, 2000, 22(1): 75-76
- [62] Adam T. Draushuk, Barbara P. McGarrigle¹, Kristin E. Larsen², et al. Detection of CYP1A1 protein in human liver and induction by TCDD in precision-cut liver slices incubated in dynamic organ culture[J]. Carcinogenesis, 1998, 119(8): 1361-1368
- [63] Adams, S. S., Bresloff, P. and Manson, C. G. Pharmacological differences between the optical isomers of ibuprofen: evidence for metabolic inversion of the isomer[J]. J. Pharm. Pharmacol. 1976, 28: 256-257,
- [64] Ahotupa M, Bereziat JC, Bussacchini-Griot V, Camus AM, Bartsch H. Lipid peroxidation induced by N-nitrosodimethylamine (NDMA) in rats in vivo and in isolated hepatocytes[J]. Free Radic Res Commun. 1987; 3(1-5): 285-91
- [65] Anadon A, Martinez-Larranaga MR, Diaz, MJ et al. Pharmacokinetic and residue studies of quinolone compounds and olaquinox in poultry[J]. Ann Rech Vet, January 1, 1990; 21 Suppl 1: 137S-144S.
- [66] Anders Hay Sørensen, Lars Hestbjerg Hansen, Elsebetta Johannesen, et al. Conjugative Plasmid Conferring Resistance to Olaquinox[J]. Antimicrob. Agents Chemother, 2003, 47: 798~799
- [67] Augustyniak A, Michalak K, Skrzydlewska E. The action of oxidative stress induced by ethanol on the central nervous system (CNS) [J]. Postepy Hig Med Dosw. 2005; 59: 464-71
- [68] Bardag-Gorce F, Wilson L, Nan L, et al. CYP2E1 inhibition enhances mallory body formation[J]. Exp Mol Pathol. 2005, 78(3): 207-11
- [69] Behrends A, Hardeland R, Ness H. Photocatalytic actions of the pesticide metabolite 2-hydroxyquinoxaline:

- destruction of antioxidant vitamins and biogenic amines - implications of organic redox cycling[J]. Redox Rep. 2004;9(5):279-88.
- [70] Bello SM, Franks DG, Stegeman JJ, et al. Acquired resistance to Ah receptor agonists in a population of Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*) inhabiting a marine superfund site: in vivo and in vitro studies on the inducibility of xenobiotic metabolizing enzymes[J]. Toxicol Sci. 2001, 60(1):77-91.
- [71] Bian K, Murad F. Nitric oxide (NO)--biogenesis, regulation, and relevance to human diseases[J]. Front Biosci. 2003, 8:d264-78.
- [72] Bruce A. Freeman., James D. Crapo., Biology of disease free radicals and tissue injury[J]. Laboratory Investigation. 1982, 47(5):412
- [73] Burkhardt O, Borner K, Nicolas von der Höh, et al. Single- and multiple-dose pharmacokinetics of linezolid and co-amoxiclav in healthy human volunteers[J]. J. Antimicrob. Chemother, 2002, 50: 707~712
- [74] Calabrese V, Lodi R, Tonon C, et al. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cellular stress response in Friedreich's ataxia[J]. J Neurol Sci, 2005, 233(1-2):145-62.
- [75] Canals S, Casarejos MJ, Rodriguez-Martin E, et al. Neurotrophic and neurotoxic effects of nitric oxide on fetal midbrain cultures[J]. J Neurochem, 2001; 76(1): 56~68.
- [76] Carr B, Norcross R, Fang Y, et al. Characterization of the rhesus monkey CYP3A64 enzyme: species comparisons of CYP3A substrate specificity and kinetics using baculovirus-expressed recombinant enzymes[J]. Drug Metab Dispos. 2006, 34(10):1703-12.
- [77] Carta A, Corona P, Loriga M. Quinoxaline 1,4-dioxide: A versatile scaffold endowed with manifold activities[J]. Current Medicine Chemistry, 2005, 12:2359~72
- [78] Cederbrant K, Marcusson-Stahl M, Condevaux F, et al. NK-cell activity in immunotoxicity drug evaluation [J]. Toxicology, 2003; 185:241.
- [79] Charles J. Lowenstein, Jay L. Dinerman, and Solomon H. Snyder. Nitric Oxide: A Physiologic Messenger[J]. Ann Intern Med, Feb 1994; 120: 227 - 237.
- [80] Coles BF, Kadlubar FF. Detoxification of electrophilic compounds by glutathione S-transferase catalysis: determinants of individual response to chemical carcinogens and chemotherapeutic drugs? [J]. Biofactors. 2003; 17(1-4):115-30
- [81] Comhair SA, Erzurum SC. The regulation and role of extracellular glutathione peroxidase[J]. Antioxid Redox Signal. 2005, 7(1-2):72-9
- [82] Connie L. Smith and Keith R. Powell. Review of the Sulfonamides and Trimethoprim[J]. Pediatr. Rev, 2000, 21: 368~371
- [83] Coon MJ, Ding XX, Pernecky SJ, et al. Cytochrome P450 : progress and predictions[J]. FASEBJ. 6:669-673; 1992.
- [84] Day KC, Plopper CG, Fanucchi MV. Age-specific pulmonary cytochrome P-450 3A1 expression in postnatal and adult rats[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2006, 291(1):L75-83.
- [85] Delvecchio FC, Brizuela RM, Khan SR, et al. Citrate and vitamin E blunt the shock wave-induced free radical surge in an in vitro cell culture model[J]. Urol Res. 2005, 33(6):448-52.
- [86] Deneke SM. Thiol-based antioxidants[J]. Curr Top Cell Regul. 2000, 36:151-80.
- [87] Dey A, Yadav S, Dhawan A, et al. Evidence for cytochrome P450 3A expression and catalytic activity in rat blood lymphocytes[J]. Life Sci. 2006, 79(18):1729-35
- [88] Djordjevic V B. Free radicals in cell biology[J]. Int Rev Cytol, 2004; 237:57-89.
- [89] Draper HH, Hadley M. A review of recent studies on the metabolism of exogenous and endogenous malondialdehyde[J]. Xenobiotica. 1990, 20(9):901-7
- [90] Dunlap KL, Reynolds AJ, Duffy LK. Total antioxidant power in sled dogs supplemented with blueberries and the comparison of blood parameters associated with exercise[J]. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 2006, 143(4):429-34
- [91] Dwivedi S, Sharma R, Sharma A, et al. The course of CCl₄ induced hepatotoxicity is altered in mGSTA4-4 null (-/-) mice[J]. Toxicology. 2006, 20:218(1):58-66
- [92] E Boyland, LF Chasseaud. Glutathione S-alkyltransferase. Biochem J, 1969, 109(4):651-661
- [93] Eke BC and Ekan M IÇ. Effects of cigarette smoke with different tar contents on hepatic and pulmonary xenobiotic metabolizing enzymes in rats[J]. Human & Experimental Toxicology, 2002, 21: 17 - 23

- [94] Eliasson E, Mkrtchian S, Ingelman-Sundberg M. Hormone- and substrate-regulated intracellular degradation of cytochrome P450 (2E1) involving MgATP-activated rapid proteolysis in the endoplasmic reticulum membranes[J]. *J Biol Chem*. 1992, 267(22):15765-9
- [95] Eric Jüttler, Victoria Tarabin, and Markus Schwaninger. Interleukin-6 (IL-6): A Possible Neuromodulator Induced by Neuronal Activity[J]. *Neuroscientist*, 2002, 8: 268 - 275.
- [96] Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*. 2002 Oct;18(10):872-9
- [97] Farombi EO, Nwankwo JO, Emerole GO. Modulation of carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation and xenobiotic-metabolizing enzymes in rats fed browned yam flour diet[J]. *Afr J Med Med Sci*, 2000,29(2):127-32.
- [98] Fischer V, Harman LS, West PR, et al. Direct electron spin resonance detection of free radical intermediates during the peroxidase catalyzed oxidation of phenacetin metabolites[J]. *Chem Biol Interact*. 1986, 60(2):115-27
- [99] Fiscus RR. Involvement of cyclic GMP and protein kinase G in the regulation of apoptosis and survival in neural cells[J]. *Neurosignals*. 2002, 11(4):175-90.
- [100] FL Kiechle and T Malinski. Indirect detection of nitric oxide effects: a review[J]. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, Nov 1996; 26: 501 - 511.
- [101] Flohe L, Jaeger T, Pilawa S, Sztajer H. Thiol-dependent peroxidases care little about homology-based assignments of function[J]. *Redox Rep*. 2003,8(5):256-64.
- [102] Foti MC, Ingold KU. Mechanism of inhibition of lipid peroxidation by gamma-terpinene, an unusual and potentially useful hydrocarbon antioxidant[J]. *J Agric Food Chem*. 2003, 23;51(9):2758-65.
- [103] Franco AA, Odom RS, Rando TA. Regulation of antioxidant enzyme gene expression in response to oxidative stress and during differentiation of mouse skeletal muscle[J]. *Free Radic Biol Med*. 1999, 27(9-10):1122-32
- [104] Fujii-Kuriyama Y, Imataka H, Sogawa K, Yasumoto K, Kikuchi Y. Regulation of CYP1A1 expression[J]. *FASEB J*. 1992, 6(2):706-10
- [105] Furchgott, R. F., and Zawadzki, J. V.. The obligatory role of the endothelium in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 1980, 288, 373-376.
- [106] Gattoni A, Parlato A, Vangieri B, et al. Interferon-gamma: biologic functions and HCV therapy (type I/II) (2 of 2 parts) [J]. *Clin Ter*. 2006, 157(5):457-68.
- [107] Gelboin HV, Krausz K. Monoclonal antibodies and multifunctional cytochrome p450: drug metabolism as paradigm[J]. *Journal of Clinical Pharmacology*, 2006, 46(3):353-372.
- [108] George. SK, Najera L, Sandoval RP, et al. The Hydrophobic Domain of Cytochrome b5 Is Capable of Anchoring α -Galactosidase in Escherichia coli Membranes[J]. *Journal of Bacteriology*, 1989, 171(9): 4569-4576
- [109] Ghezzi P, Bonetto V, Fratelli M. Thiol-disulfide balance: from the concept of oxidative stress to that of redox regulation[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2005,7(7-8):964-72.
- [110] Girre C, Lucas D, Hispard E, et al. Menez C, Dally S, Menez JF. Assessment of cytochrome P450 2E1 induction in alcoholic patients by chlorzoxazone pharmacokinetics[J]. *Biochem Pharmacol*. 1994,47(9):1503-8.
- [111] Gladek A and Liehr JG. Mechanism of genotoxicity of diethylstilbestrol in vivo[J]. *J. Biol. Chem*, 1989,264:16847~16852
- [112] Gonzalez FJ, Kasper CB. Cloning and characterization of the rat NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase gene[J]. *J Biol Chem*. 1983, 258(2):1363-8.
- [113] Gonzalez FJ, Song BJ, Hardwick JP. Pregnenolone 16 α -carbonitrile-inducible P-450 gene family: gene conversion and differential regulation[J]. *Mol Cell Biol*. 1986, 6(8):2969-76.
- [114] Gut I, Ojima I, Vaclavikova R, et al. Metabolism of new-generation taxanes in human, pig, minipig and rat liver microsomes[J]. *Xenobiotica*. 2006, 36(9):772-92.
- [115] Handy DE, Hang G, Scolaro J, et al. Aminoglycosides decrease glutathione peroxidase-1 activity by interfering with selenocysteine incorporation[J]. *J Biol Chem*. 2006, 281(6):3382-8.
- [116] Hastings KL, Eihage J, Jacobs A, et al. Letter to the editor[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2003,190 (1):91-92.
- [117] Hayes JD and Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance[J]. *Biochemistry and Molecular Biology*, 2006, 30(6): 445-600.
- [118] Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45:51-88
- [119] Hersh EV, Moore PA. Drug interactions in dentistry: the importance of knowing your CYPs[J]. *J Am Dent Assoc*.

- 2004, 135(3):298-311
- [120] Hirotaka Imai. Biological significance of lipid hydroperoxide and its reducing enzyme, phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase in mammalian cells[J]. The pharmaceutical society of Japan, 2004, 124(12):937-957
- [121] Holsapple MP, Paustenbach DJ, Charnley G, et al. Symposium summary: Children's Health Risk-What's So Special about the Developing Immune System? Toxicology and Applied Pharmacology; 2004,199(1): 296~319
- [122] Holt DE, Ryder TA, Fairbairn A, et al. The myelotoxicity of chloramphenicol: in vitro and in vivo studies: I. In vitro effects on cells in culture[J]. Hum Exp Toxicol. 1997, 16(10):570-6
- [123] Hong JY, Ning SM, Ma BL, et al. Roles of pituitary hormones in the regulation of hepatic cytochrome P450IIE1 in rats and mice[J]. Arch Biochem Biophys. 1990, 15;281(1):132-8
- [124] Huggett RJ, Neff JM, Stegeman JJ, et al. Biomarkers of PAH exposure in an intertidal fish species from Prince William Sound, Alaska: 2004-2005[J]. Environ Sci Technol. 2006, 40(20):6513-7
- [125] Hultquist DE, Slaughter SR, Douglas RH, et al. Erythrocyte cytochrome b5; structure, role in methemoglobin reduction, and solubilization from endoplasmic reticulum[J]. Prog. Clin. Biol. Res. 1978,21:199-216.
- [126] Hummerich J, Zohm C, Pfau W. Modulation of cytochrome P450 1A1 by food-derived heterocyclic aromatic amines[J]. Toxicology. 2004 ,199(2-3):231-40.
- [127] Hung RJ, Boffetta P, Brennan P, et al. Genetic polymorphisms of MPO, COMT, Mn-SOD interactions with environmental exposures and bladder cancer risk[J]. Carcinogenesis, 2004, 25(6):973-8.
- [128] Hwang JM, Wang CJ, Chou FP, et al, Protective effect of baicalin on tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatotoxicity[J]. Arch Toxicol. 2005, 79(2):102-9.
- [129] Inbaraj JJ, Bilski P, Chignell CF. Photophysical and Photochemical Studies of 2-Phenylbenzimidazole and UVB Sunscreen 2-phenylbenzimidazole-5-sulfonic acid. Photochemistry and Photobiology.2002, 75(2):107-116
- [130] Ingelman-Sundberg M, Johansson I, Penttila KE, Glaumann H, et al. Centrilobular expression of ethanol-inducible cytochrome P-450 (IIE1) in rat liver[J]. Biochem Biophys Res Commun. 1988, 157(1):55-60
- [131] J van Grevenynghe, S Rion, E Le Ferrec, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit differentiation of human monocytes into macrophages. J Immunol. 2003,170(5):2374-81
- [132] Janisch K M, Milde J, Schempp H, et al. Vitamin C, vitamin E and flavonoids[J]. Dev Ophthalmol, 2005;38:59-69.
- [133] Jeannette V V, B. Kalyanaraman, Mary C K. Mitochondrial aconitase is a source of hydroxyl radical [J]. The Journal of Biology Chemistry, 2000,275(19):14064-14069
- [134] JJ Inbaraj, AG Motten, and CF Chignell . Photochemical and photobiological studies of tirapazamine (SR 4233) and related quinoxaline 1,4-Di-N-oxide analogues[J]. Chem Res Toxicol, 2003,16(2):164~70.
- [135] Jones DP, Brown LA, Sternberg P. Variability in glutathione-dependent detoxication in vivo and its relevance to detoxication of chemical mixtures[J]. Toxicology. 1995, 105(2-3):267-74.
- [136] Josephy PD, Batty SM, Boverhof DR. Recombinant human P450 forms 1A1, 1A2, and 1B1 catalyze the bioactivation of heterocyclic amine mutagens in Escherichia coli lacZ strains[J]. Environ Mol Mutagen. 2001;38(1):12-8.
- [137] Juranek I, Bezek S. Controversy of free radical hypothesis: reactive oxygen species--cause or consequence of tissue injury?[J]. Gen Physiol Biophys, 2005,24(3):263-78.
- [138] Kachula SO, Pentiuk OO. Effect of starvation and acetone on the enzyme systems of biotransformation and toxicity of xenobiotics--CYP2E1 substrates in rats[J]. Ukr Biokhim Zh. 2004, 76(1):114-22.
- [139] Kamdem LK, Meineke I, Godtel-Armbrust U, Brockmoller J, Wojnowski L. Dominant contribution of P450 3A4 to the hepatic carcinogenic activation of aflatoxin B1[J]. Chem Res Toxicol. 2006, 19(4):577-86.
- [140] Kapoor N, Pant AB, Dhawan A, et al. Cytochrome P450 1A isoenzymes in brain cells: Expression and inducibility in cultured rat brain neuronal and glial cells[J]. Life Sci. 2006, 79(25):2387-94
- [141] Karthik Venkatakrishnan, Lisa L. Von Moltke, Michael H. C, et al. Comparison Between Cytochrome P450 (Cyp) Content and Relative Activity Approaches to Scaling From Cdna-Expressed Cyps to Human Liver Microsomes: Ratios of Accessory Proteins as Sources of Discrepancies Between The Approaches[J]. Drug Metabolism And Disposition, 2002, 28(12):1493-1504
- [142] Keller C, Webb A, and Davis J. Cytokines in the seronegative spondyloarthropathies and their modification by TNF blockade: a brief report and literature review[J]. Ann Rheum Dis, 2003, 62: 1128~1134.
- [143] Kim ND, Kim SG. Chemopreventive effects of 2-(allylthio)pyrazine[J]. Arch Pharm Res. 1999 , 22(2):99-107.

- [144] Kisselev P, Schunck WH, Roots I, Schwarz D. Association of CYP1A1 polymorphisms with differential metabolic activation of 17 β -estradiol and estrone[J]. *Cancer Res.* 2005, 65(7):2972-8.
- [145] Koop DR, Crump BL, Nordblom GD, et al. Immunochemical evidence for induction of the alcohol-oxidizing cytochrome P-450 of rabbit liver microsomes by diverse agents: ethanol, imidazole, trichloroethylene, acetone, pyrazole, and isoniazid[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985, 82(12):4065-9.
- [146] Kretzschmar M, Klinger W. The hepatic glutathione system--influences of xenobiotics[J]. *Exp Pathol.* 1990, 38(3):145-64.
- [147] Krezel A, Bal W. Coordination chemistry of glutathione[J]. *Acta Biochim Pol.* 1999, 46(3):567-80.
- [148] Kuzhuvelil Bhaskarannair, Hari Kumar and Ramadasan Kuttan. Inhibition of Drug Metabolizing Enzymes (Cytochrome P450) in Vitro as Well as in Vivo by *Phyllanthus amarus* SCHUM & THONN[J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2006, 29 (7):1310-13
- [149] Labro MT. Interference of Antibacterial Agents with Phagocyte Functions: Immunomodulation or "Immuno-Fairy Tales"?[J]. *Clin. Microbiol. Rev.* 2000,13: 615~650.
- [150] Laird S. M, Tuckerman E. M, Cork B. A, et al. A review of immune cells and molecules in women with recurrent miscarriage[J]. *Hum. Reprod. Update*, 2003, 9: 163 - 174.
- [151] Lee DH, OConner TR, Pfeifer GP. Oxidative DNA damage induced by copper and hydrogen peroxide promotes CG-TT tandem mutations at methylated CpG dinucleotides in nucleotide excision repair deficient cells[J]. *Nucleic acids research*, 2002, 30(16):3566-3573
- [152] Lee DY, Shin HS, Bae SK, et al. Effects of enzyme inducers and inhibitors on the pharmacokinetics of intravenous omeprazole in rats[J]. *Biopharm Drug Dispos.* 2006, 27(5):209-18.
- [153] Lieber CS. Carbohydrate deficient transferrin in alcoholic liver disease: mechanisms and clinical implications[J]. *Alcohol.* 1999,19(3):249-54.
- [154] Lin D, Meyer DJ, Ketterer B, et al. Effects of human and rat glutathione S-transferases on the covalent DNA binding of the N-acetoxy derivatives of heterocyclic amine carcinogens in vitro: a possible mechanism of organ specificity in their carcinogenesis[J]. *Cancer Research*, 2000, 54(18): 4920~26.
- [155] Liu JH, Lu YH. Role of pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development[J]. *Pharmacological Review*, 1997, 49(4):404~449
- [156] Lomaestro BM, Malone M. Glutathione in health and disease: pharmacotherapeutic issues[J]. *Ann Pharmacother.* 1995, 29(12):1263-73.
- [157] Loots DT, Wiid IJ, Page BJ, et al. Melatonin prevents the free radical and MADD metabolic profiles induced by antituberculosis drugs in an animal model[J]. *J Pineal Res.* 2005, 38(2):100-6.
- [158] LoVerde PT, Carvalho-Queiroz C, Cook R. Vaccination with antioxidant enzymes confers protective immunity against challenge infection with *Schistosoma mansoni*[J]. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004, 99(5 Suppl 1):37-43
- [159] Lu AH, Shu Y, Huang SL, et al. In vitro proguanil activation to cycloguanil is mediated by CYP2C19 and CYP3A4 in adult Chinese liver microsomes[J]. *Acta Pharmacol Sin.* 2000, 21(8):747-52
- [160] Lu SC. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies[J]. *FASEB J.* 1999, 13(10):1169-83.
- [161] Ma Y, Sachdeva K, Liu J, et al. Desmethoxyyangonin and Dihydromethysticin are two major pharmacological kavalactones with marked activity on the induction of CYP3A23[J]. *Drug Metabolism and Disposition*, 2004, 32 (11):1317-1324.
- [162] Maeda H, Sawa T, Yubisui T, et al. Free radical generation from heterocyclic amines by cytochrome b5 reductase in the presence of NADH[J]. *Cancer Lett.* 1999, 143(2): 117-121.
- [163] Mahnke A, Strotkamp D, Roos PH, et al. Expression and inducibility of cytochrome P450 3A9 (CYP3A9) and other members of the CYP3A subfamily in rat liver[J]. *Arch Biochem Biophys.* 1997, 337(1):62-8.
- [164] Masson LF, Sharp L, Cotton SC, Little J. Cytochrome P-450 1A1 gene polymorphisms and risk of breast cancer: a HuGE review[J]. *Am J Epidemiol.* 2005, 161(10):901-15.
- [165] Matsubara T, Kim H. J, Miyata M, et al. Isolation and characterization of a new major intestinal CYP3A form, CYP3A62, in the rat[J]. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 2004, 309, (3): 1282-1290
- [166] McIlwain CC, Townsend DM, Tew KD. Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy[J]. *Oncogene.* 2006, 25(11):1639-48.

- [167] McIlwain CC, Townsend DM, Tew KD. Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy[J]. *Oncogene*. 2006, 25(11):1639-48.
- [168] Melidou M; Riganakos K; Galaris D. Protection against nuclear DNA damage offered by flavonoids in cells exposed to hydrogen peroxide: the role of iron chelation[J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2005, 39(12):548-556
- [169] Meredith C, Scott M. P, Renwick A. B, et al. Studies on the induction of rat hepatic CYP1A, CYP2B, CYP3A and CYP4A subfamily form mRNAs in vivo and in vitro using pre-cision-cut rat liver slices[J]. *xenobiotica*, 2003, 33(5): 511-527
- [170] Moorthy B, Chen S, Li D and Randerath K. 3-Methylcholanthrene-inducible liver cytochrome(s) P450 in female Sprague-Dawley rats: Possible link between P450 turnover and formation of DNA adducts and I-compounds[J]. *Carcinogenesis*, 1993, 14:879-886.
- [171] Moorthy B, Parker KM, Smith CV, et al. Potentiation of oxygen-induced lung injury in rats by the mechanism-based cytochrome P-450 inhibitor, 1-aminobenzotriazole[J]. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000b, 292(2):553-60.
- [172] Moorthy B, Parker KM, Smith CV, et al. Potentiation of oxygen-induced lung injury in rats by the mechanism-based cytochrome P450 inhibitor, 1-aminobenzotriazole[J]. *J Pharmacol Exp Ther* 2000, 292:553-560.
- [173] Mori Y, Koide A, Kobayashi Y, et al. Effects of cigarette smoke and a heterocyclic amine, MeIQx on cytochrome P-450, mutagenic activation of various carcinogens and glucuronidation in rat liver[J]. *Mutagenesis*. 2003, 18(1):87-93.
- [174] Morioka Y, Nishimura M, Imai T, et al. Assessment of induction of cytochrome P450 by NO-1886 (ibrolipim), a lipoprotein lipase-promoting agent, in primary cultures of human hepatocytes and in female rat liver[J]. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2006, 21(1):19-28.
- [175] Morishima Y, Peng HM, Lin HL, et al. Regulation of cytochrome P450 2E1 by heat shock protein 90-dependent stabilization and CHIP-dependent proteasomal degradation[J]. *Biochemistry*. 2005, 44(49):16333-40.
- [176] Murad F. Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling[J]. *Biosci Rep*. 2004, 24(4-5):452-74.
- [177] Murata M, Kobayashi M, and Kawanishi S. Mechanism of oxidative DNA damage induced by a heterocyclic amine, 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5f] quinoxaline[J]. *Jpn J Cancer Res*, 1999; 90(3): 268-75.
- [178] Nagata K, Murayama N, Miyata M, et al. Isolation and characterization of a new rat P450 (CYP3A18) cDNA encoding P450(6)beta-2 catalyzing testosterone 6 beta- and 16 alpha-hydroxylations[J]. *Pharmacogenetics*. 1996, 6(1):103-11.
- [179] Nash T. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction[J]. 1953, 55(3):416-421
- [180] Neve EP, Ingelman-Sundberg M. A soluble NH₂-terminally truncated catalytically active form of rat cytochrome P450 2E1 targeted to liver mitochondria(1) [J]. *FEBS Lett*. 1999, 460(2):309-14
- [181] Neve EP, Ingelman-Sundberg M. Identification and characterization of a mitochondrial targeting signal in rat cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) [J]. *J Biol Chem*. 2001, 276(14):11317-22.
- [182] Nicholas J. Van Wagoner, Jae-Wook Oh, Pavle Repovic, et al. Benveniste. Interleukin-6 (IL-6) Production by Astrocytes: Autocrine Regulation by IL-6 and the Soluble IL-6 Receptor[J]. *J. Neurosci*, 1999, 19: 5236.
- [183] Noreault-Conti TL, Jacobs JM, Trask HW, et al. Effect of proteasome inhibition on toxicity and CYP3A23 induction in cultured rat hepatocytes: Comparison with arsenite[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2006, 217(3):245-51.
- [184] Nunez-Vergara LJ, Sturm JC, Olea-Azar C, et al. Electrochemical, UV-visible and EPR studies on nitrofurantoin: nitro radical anion generation and its interaction with glutathione[J]. *Free Radic Res*. 2000, 32(5):399-409.
- [185] Oleg Mirochnitchenko, Miriam Weisbrot-Lefkowitz, Kenneth Reuhl, et al. Acetaminophen Toxicity- Opposite Effects Of Two Forms Of Glutathione Peroxidase[J]. *The Journal Of Biological Chemistry*. 1999, 274(15):10349-10355,
- [186] Olsson KA, Harnek J, Ohlin AK, et al. No increase of plasma malondialdehyde after primary coronary angioplasty for acute myocardial infarction[J]. *Scand Cardiovasc J*. 2002, 36(4):237-40
- [187] Peng JZ, Remmel RP, Sawchuk RJ. Inhibition of murine cytochrome P4501A by tacrine: in vitro studies[J]. *Drug Metab Dispos*, 2004, 32(8):805-812.
- [188] Pentiuk OO, Kachula SO, Herych OKh. [Cytochrome P4502E1. Polymorphism, physiological function, regulation, and role in pathology[J]. *Ukr Biokhim Zh*. 2004, 76(5):16-28.
- [189] Peter A. Behnisch, Kaxunori Hosoe and Sakai, S. Bioanalytical screening methods for dioxins and dioxin-like

- compounds: A review of bioassay/biomarker technology[J]. *Eviron. Int.* 2001,27:413-439
- [190] Peter A. Behnisch, Kaxunori Hosoe, Abraham Brouwer, et al. Screening of Dioxin-like Toxicity Equivalents for Various Matrices with Wildtype and Recombinant Rat Hepatoma H4IIE Cells[J]. *Toxicological Sciences*, 2002, 69:125-130
- [191] Peter Ball. Quinolone generations: natural history or natural selection? [J]. *J. Antimicrob. Chemother.* 2000, 46: 17 – 24
- [192] Peter Moller, Hakan Wallin, Ulla Vogel, et al., Mutagenicity of 2-amino-3-methylimidazo [4,5-f] quinoline in colon and liver of big blue rats: role of DNA adducts, strand breaks, DNA repair and oxidative stress[J]. *Carcinogenesis*, 2002, 23(8):1379~1385.
- [193] Pocsí I, Prade RA, Penninckx MJ. Glutathione, altruistic metabolite in fungi[J]. *Adv Microb Physiol.* 2004,49:1-76.
- [194] RA Prentis, Y Lin, SR Walker. Pharmaceutical innovation by the seven UK-owned pharmaceutical companies[J]. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1988,25(3):387~396
- [195] Rashid MA, Hagihara B, Kobayashi M, et al. Structural studies of cytochrome b5. 3. Sequential studies on human liver cytochrome b5[J]. *J Biochem.* 1973,74(5):985-1002
- [196] Regoli F, Gorbi S, Frenzilli G, et al. Oxidative stress in ecotoxicology: from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach[J]. *Mar Environ Res*, 2002,54(3-5):419-23.
- [197] Robert F. Schwabe and David A. Brenner. Mechanisms of Liver Injury. I. TNF--induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006, 290: 583 -589.
- [198] Robin MA, Anandatheerthavarada HK, Fang JK, et al. Mitochondrial targeted cytochrome P450 2E1 (P450 MT5) contains an intact N terminus and requires mitochondrial specific electron transfer proteins for activity[J]. *J Biol Chem.* 2001,276(27):24680-9.
- [199] Ronald R. & Low D. E. . Fluoroquinolone Antibiotics. Milestones in Drug Therapy[M]. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland, 2003. 261
- [200] Ross A McKinnon. Cytochrome P450 I. Multiplicity and Function[J]. *Aust J Hosp Pharm* 2000, 30: 54-6.
- [201] Sadrieh N, Snyderwine EG. Cytochromes P450 in cynomolgus monkeys mutagenically activate 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) but not 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) [J]. *Carcinogenesis*. 1995, 16(7):1549-55.
- [202] Salinas AE, Wong MG. Glutathione S-transferases--a review[J]. *Curr Med Chem.* 1999, 6(4):279-309.
- [203] Sargis R M, Subbiah P V. Protection of membrane cholesterol by sphingomyelin against free radical-mediated oxidation[J], 2006,40(12):2092-102
- [204] Sarkar S, Khan MF, Kaphalia BS, et al. Methyl palmitate inhibits lipopolysaccharide-stimulated phagocytic activity of rat peritoneal macrophages[J]. *J Biochem Mol Toxicol.* 2006, 20(6):302-308
- [205] Sato K, Akaike T, Kojima Y, Ando M, Nagao M, Maeda H. Evidence of direct generation of oxygen free radicals from heterocyclic amines by NADPH/cytochrome P-450 reductase in vitro. *Jpn J Cancer Res*, 1992, 83:1204-1209
- [206] Serino F, Grevel J, Napoli KL, et al. Generation of oxygen free radicals during the metabolism of cyclosporine A: a cause-effect relationship with metabolism inhibition[J]. *Mol Cell Biochem.* 1993, 122(2):101-12.
- [207] Shampo MA, Kyle RA, Steensma DP. Mayo Ferid Murad--1998 Nobel laureate for nitric oxide research[J]. *Clin Proc.* 2004, 79(10):1230.
- [208] Sheehan D, McIntosh J, Power A, et al. Drug metabolizing enzymes of mussels as bioindicators of chemical pollution[J]. *Biochem Soc Trans.* 1995, 23(2):419-22
- [209] Sheehan D, Meade G, Foley VM, et al. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily[J]. *Biochem J.* 2001, 360(1):1-16.
- [210] Shen W, Hoener B. Mitigation of nitrofurantoin-induced toxicity in the perfused rat liver[J]. *Hum Exp Toxicol.* 1996, 15(5):428-34.
- [211] Shen, T. Y.: Perspectives in non-steroidal anti-inflammatory agents[J]. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1972, 11: 460-472
- [212] Singab AN, Youssef DT, Noaman E, et al. Hepatoprotective effect of flavonol glycosides rich fraction from Egyptian *Vicia calcarata* Desf. against CCl4-induced liver damage in rats[J]. *Arch Pharm Res.* 2005, 28(7):791-8.
- [213] Smith CL. and Powell K R.. Review of the Sulfonamides and Trimethoprim[J]. *Pediatr. Rev.* 2000, 21: 368~371
- [214] Spiteller G. The relation of lipid peroxidation processes with atherogenesis: a new theory on atherogenesis[J]. *Mol*

- Nutr Food Res. 2005, 49(11):999-1013.
- [215] Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins[J]. Amino Acids, 2003,25(3-4):207-18.
- [216] Stevens GN, Joiner MC, Joiner B, et al. Role of glutathione peroxidase in the radiation response of mouse kidney[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1989,16(5):1213-7
- [217] Suter W, Rosselet A, Knusel. Mode of action of quinoxin and substituted quinoxaline-di-N-oxide on Escherichia coli[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1978,13(5):770~789
- [218] Townsend DM, Findlay VL, Tew KD. Glutathione S-transferases as regulators of kinase pathways and anticancer drug targets[J]. Methods Enzymol. 2005, 401:287-307
- [219] Tucher M J. Carcinogenic action of quinoxaline-1,4-dioxide in rats [J]. Journal of the National Cancer Institute, 1975, 55(1):137~140.
- [220] Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, et al. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2006,64(2):178-89.
- [221] Valdez L B, Lores Arnaiz S, Bustamante J, et al. Free radical chemistry in biological systems[J]. Biol Res, 2000;33(2):65-70.
- [222] Valdez, LB; Zabornyi, T; Boveris, A. Mitochondrial metabolic states and membrane potential modulate mtNOS activity. Biochimica et Biophysica Acta. 2006, 1757(3):358-245
- [223] Valerie B. O'Donnell and Bruce A. Freeman Interactions Between Nitric Oxide and Lipid Oxidation Pathways : Implications for Vascular Disease. Circ. Res., Jan 2001; 88: 12.
- [224] Van den Branden C, Deman A, Ceysens B, et al. Vitamin E protects renal antioxidant enzymes and attenuates glomerulosclerosis in Adriamycin-treated rats[J]. Nephron. 2002, 91(1):129-33
- [225] Vannucchi H, Vianna SM, Meirelles MS, et al. Lipid peroxidation and urinary excretion of vitamin E in rats submitted to an immunological inflammatory process[J]. Drug Chem Toxicol. 2003, 26(4):285-93.
- [226] Vences-Mejia A, Labra-Ruiz N, Hernandez-Martinez N, et al. The effect of aspartame on rat brain xenobiotic-metabolizing enzymes[J]. Hum Exp Toxicol, 2006, 25(8):453-9.
- [227] Videla S, Vilaseca J, Medina C, et al. Modulatory Effect of Nitric Oxide on Mast Cells During Induction of Dextran Sulfate Sodium Colitis[J]. Dig Dis Sci. 2006,8: [Epub ahead of print]
- [228] Wan J, Ernstgard L, Song BJ, et al. Chlorzoxazone metabolism is increased in fasted Sprague-Dawley rats[J]. J Pharm Pharmacol. 2006, 58(1):51-61.
- [229] Wan X, Ma T, Wu W, Wang Z. EROD activities in a primary cell culture of grass carp (Ctenopharyngodon idellus) hepatocytes exposed to polychlorinated aromatic hydrocarbons[J]. Ecotoxicol Environ Saf. 2004, 58(1):84-9
- [230] Webster N. R. and Nunn J. F. Molecular Structure Of Free Radicals And Their Importance In Biological Reactions. Br. J. Anaesth, 1988; 60: 98 – 108
- [231] Wise R. Nasopharyngeal carriage of Streptococcus pneumoniae: a review of the potential role of pharmacokinetics and pharmacodynamics[J]. J. Antimicrob. Chemother, 2002,50:45~50
- [232] Woodcroft KJ, Hafner MS, Novak RF. Insulin signaling in the transcriptional and posttranscriptional regulation of CYP2E1 expression[J]. Hepatology. 2002,35(2):263-73.
- [233] Wrigton SA, Thomas PE, Molowa DT, et al. Characterization of ethanol-inducible human liver N-nitrosodimethylamine demethylase[J]. Biochemistry. 1986, 25(22):6731-5
- [234] Yun Jiang and Goran Moller. IL-2 may be a limiting factor precluding lymphocytes from genetically resistant mice from responding to HgCl₂[J]. International Immunology, 1999, 11(5):627~633
- [235] Yung LM, Leung FP, Yao X, et al. Reactive oxygen species in vascular wall Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets. 2006 Mar;6(1):1-19
- [236] Zhang H, Myshkin E, Waskell L. Role of cytochrome b5 in catalysis by cytochrome P450 2B4. Biochem Biophys[J] Res Commun. 2005, 338(1):499-506
- [237] Zhu YJ, Wang QS, Zhang LP, et al. Time dependent changes in antioxidation of rat serums and sciatic nerves caused by toxicology[J]. Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi. 2006, 24(7):394-8

致 谢

本论文是在杨志强研究员和梁剑平研究员的悉心指导下，于中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所完成的。从论文的立题、构思、技术路线乃至毕业论文写作等方面，导师给予了精心的指导，在生活中给予了亲切的关怀，为此付出了大量心血。三年来，导师在学术上敏锐的洞察力、实事求是的作风对本研究带来了巨大的影响，严谨的科研态度、执著的学术追求及忘我的工作态度，为学生今后的工作树立了榜样。在此论文完稿之际，特向导师们致以深深的敬意和诚挚的感谢！

在此，感谢兰州畜牧与兽药研究所领导、科技术管理处各位老师在生活上的关心和工作上的支持！

感谢张断瑜、杨国林、杨锐乐、王学智、牛晓荣、宋青、李剑勇、史颜斌、胡庭俊、程富胜、齐志明、严作庭、孟嘉仁、荔霞、刘世祥、蒲万霞、王玲、吕嘉文、董鹏程、李世宏等老师的大力帮助。

感谢兰州畜牧与兽药研究所硕士研究生吴永章、莽莉萍、车业贵、高杰、袁晓科、朱新书等同学的热心帮助。

感谢甘肃省兽药饲料检测监察所兀征副所长在样品检测中给予的帮助。

感谢中国科学院兰州化学物理研究所柳军席在实验中的帮助。

特别感谢我的妻子三年对我工作的理解和支持。

感谢我的父母在生活上的支持和工作上的鼓励。

最后对给予我帮助而未提及的领导、老师、同学及朋友表示诚挚的谢意。

本研究由国家科研院所重大专项基金项目和兰州畜牧与兽药研究所科研基金资助

作者简历

李建喜, 男, 1971 年 10 月 2 日出生, 甘肃庄浪人, 助理研究员。1995 年 6 月毕业于甘肃农业大学动物医学系, 同年到中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所预兽医研究室工作, 1999 年 9 月, 考取了中国农业科学院研究院兰州畜牧与兽药研究所硕士, 2001 年 7 月毕业并到中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所工作。2003 年 9 月考入中国农业科学院研究生院兰州畜牧与兽药研究所, 攻读博士。先后参与数十项国家、省部级科研项目, 主持课题 4 项, 先后发表科技论文 40 余篇。

在读期间发表的论文主要有:

- [1] 李建喜,王学智,杨志强. 钼和铜对小鼠抗氧化机能的影响[J]. 中国兽医科技, 2004, 34 (11): 22~25
- [2] 李建喜,杨志强,王学智,等. 肉鸡腹水综合征发病学的氧应激机制及其防治[J]. 中国兽医学报, 2003, 23 (4): 372~376
- [3] 李建喜, 杨志强, 王学智. 中兽医学的研究现状与未来展望[J]. 动物医学进展, 2005, 26(2):51-54
- [4] 李建喜, 杨志强, 王学智. 基因技术与中药现代化[J]. 中兽医医药杂志, 2005, 增刊: 497
- [5] 李建喜, 杨志强, 梁剑平, 等. 喹胺醇诱导仔猪氧化损伤的潜在性作用研究. 中国兽医学报, 已接受
- [6] 李建喜, 杨志强, 梁剑平, 等. 亚中毒剂量“喹胺醇”对大鼠组织形态学和饲料消耗影响. 黑龙江畜牧兽医, 已接受
- [7] LI Jian-xi, YANG Zhi-qiang, LIANG Jian-ping, et al. The effect of new quinoxaline 1,4-dioxide derivative (*kuianchun*) on antioxidant enzyme in weanling piglets. 中国药理毒理学杂志, 2006, 20 (3) : 233
- [8] 李建喜, 杨志强, 梁剑平, 等. 喹胺醇在猪体内的药代动力学研究. 中国畜牧兽医学会兽医药理毒理学第九次学术会论文集, 2006, P:92
- [9] 李建喜, 杨志强, 梁剑平, 等. 单剂量口服或静注喹胺醇对仔猪抗氧化机能的影响. 中国畜牧兽医学会兽医药理毒理学年会, 2006, P: 167
- [10] 李建喜, 杨志强, 梁剑平, 等. 喹胺醇对小鼠抗氧化机能的影响研究. 中国畜牧兽医学会 2006 年学术年会论文集. P:471
- [11] 李建喜, 杨志强, 王学智. 活性氧自由基在动物机体内的生物学作用. 动物医学进展, 2006, 27(10):33~35