

恩诺沙星对银鲫急性毒性及血液生化指标的影响

赵蕾^{①②} 曹海鹏^{①#} 陈辉^② 侯三玲^① 胡鲲^① 杨先乐^{①*}

① 上海海洋大学国家水生动物病原库 上海 201306;

② 江苏世盛动物药业有限公司 大丰 224100

摘要: 为了解恩诺沙星对异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 的急性毒性及血液生化指标的影响, 评价恩诺沙星对异育银鲫的安全性。本实验研究了恩诺沙星对异育银鲫的急性毒性, 并观察了恩诺沙星在不同剂量下对异育银鲫血液生化指标的影响。实验结果表明, 恩诺沙星对异育银鲫的半数致死剂量为 1 949.84 mg/kg, 安全剂量为 194.98 mg/kg。当恩诺沙星以常规给药剂量 (20 mg/kg) 连续口灌异育银鲫 30 d 时, 异育银鲫的血清总蛋白含量、谷丙转氨酶含量、谷草转氨酶、 γ -谷氨酰转移酶含量与对照组没有显著变化; 而当恩诺沙星以 40 mg/kg、80 mg/kg、160 mg/kg、320 mg/kg 的剂量连续口灌异育银鲫 30 d 时, 异育银鲫的血清谷丙转氨酶含量较对照组分别增加了 23%、30%、46%、86% ($P < 0.05$), 血清谷草转氨酶含量较对照组分别增加了 37%、42%、69%、86% ($P < 0.05$)。本研究确定了恩诺沙星对异育银鲫的安全剂量, 证实了恩诺沙星引起异育银鲫出现肝功能失调的剂量范围, 对恩诺沙星在异育银鲫养殖中的安全使用提供了科学依据, 也证实常规给药剂量 (20 mg/kg) 的恩诺沙星不会导致异育银鲫出现肝损伤。

关键词: 恩诺沙星; 异育银鲫; 急性毒性; 血液生化指标

中图分类号: Q955 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2013)03-446-05

Acute Toxicity of Enrofloxacin to *Carassius auratus gibelio* and Its Effects on Blood Biochemical Indexes

ZHAO Lei^{①②} CAO Hai-Peng^{①#} CHEN Hui^② HOU San-Ling^①
HU Kun^① YANG Xian-Le^{①*}

① Aquatic Pathogen Collection Center of Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306;

② Jiangsu Shson Animal Pharmaceutical Co. Ltd, Dafeng 224100, China

Abstract: To evaluate the safety of enrofloxacin for *Carassius auratus gibelio*, the acute toxicity of enrofloxacin and its influences on blood biochemical indicators were studied, based on the conventional dose of enrofloxacin in aquaculture. The results showed that the median lethal dose and safe dose of enrofloxacin for *C. auratus gibelio* were 1 949.84 mg/kg and 194.98 mg/kg, respectively. Compared with the control group, the content of serum total protein (TP), glutamic-pyruvic transaminase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and γ -glutamine transferase (γ -GT) were not significantly changed with the continuous oral administration at 20 mg/kg as a conventional dose for 30 days, while after the continuous oral administration at 40 mg/kg, 80 mg/kg,

基金项目 上海海洋大学研究生科研基金项目, 科技部 863 计划项目 (No. 2011AA10A216) 以及公益性行业 (农业) 科技专项资金项目 (No. 201203085), 上海高校知识服务平台项目 (No. ZF1206);

* 通讯作者, E-mail: xlyang@shou.edu.cn;

第一作者介绍 赵蕾, 女, 硕士研究生; 研究方向: 水产动物病害学; E-mail: zhaolei198712@163.com。

同等贡献第一作者 曹海鹏, 男, 讲师; 研究方向: 水产动物病害学; E-mail: hpcao@shou.edu.cn。

收稿日期: 2012-11-09, 修回日期: 2013-01-08

160 mg/kg, 320 mg/kg for 30 days, the serum AST content was significantly increased by 23%, 30%, 46%, 86% ($P < 0.05$), and the ALT content was significantly increased by 37%, 42%, 69%, 86% ($P < 0.05$), respectively. This study determined the safe dose of enrofloxacin and its administration dose range causing liver dysfunction for *C. auratus gibelio*, and provided a scientific basis for the safe use of enrofloxacin in *C. auratus gibelio*. Enrofloxacin at 20 mg/kg as a conventional dose does not result in liver dysfunction in *C. auratus gibelio*.

Key words: Enrofloxacin; *Carassius auratus gibelio*; Acute toxicity; Blood biochemical indicators

异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 是我国重要的食用经济鱼类,因其具有成活率高、食性广、生长快、产量高、适应性与抗病力强等优点而占有广阔的养殖面积。然而,在异育银鲫养殖过程中,各种细菌性病害的频发导致各种抗菌药物的使用剂量和次数增加。其中,恩诺沙星(enrofloxacin)作为第三代喹诺酮类药物,能够通过和细菌 DNA 回旋酶亚基 A 结合,抑制酶的切割与连接功能,阻止细菌 DNA 的复制而表现出良好的抗菌作用,因而已广泛应用于异育银鲫细菌性疾病的防治。例如,在异育银鲫 5~6 个月的养殖周期中(李艳 2010),一般每月使用恩诺沙星 1~2 次,然而,恩诺沙星对异育银鲫的毒性研究极其匮乏,而且近年来根据在水产养殖中的临床调查,恩诺沙星的滥用可能是异育银鲫“肝胆综合症”的重要病因(朱欣欣等 2011),但这一说法却缺乏直接的实验依据。鉴此,本实验研究了恩诺沙星对异育银鲫的急性毒性和血液生化指标的影响,旨在为恩诺沙星在异育银鲫养殖生产中的安全用药提供借鉴的同时,为其能否导致异育银鲫出现肝损伤提供证据。

1 材料与方法

1.1 材料 异育银鲫,300 尾,由上海水产养殖工程研究中心提供,平均体重(50 ± 5)g,体长(7 ± 2)cm,于实验室暂养 1 个月。盐酸恩诺沙星原粉(纯度 98.5%,批号为 20110716),购自生工生物工程(上海)有限公司;50 g/L 恩诺沙星,参照李春雨等(2009)的方法配制;HITACHI 7600-020 全自动生化分析仪;总蛋白(total protein, TP)、谷丙转氨酶(glutamate-

pyruvate transaminase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、 γ -谷酰胺转移酶(γ -glutamine transferase, γ -GT)试剂盒,购自上海申索佑福医学诊断用品有限公司。

1.2 恩诺沙星对异育银鲫的急性毒性分析

参照《GB/T13267-1991 水质 物质对淡水鱼(斑马鱼)急性毒性测定方法》,观察异育银鲫在口灌不同剂量恩诺沙星后 96 h 内不同时间的反应及死亡情况,根据概率单位图解法计算恩诺沙星对异育银鲫的半数致死剂量(50% lethal dose, LD_{50}),并根据公式,安全剂量 = $0.1 \times LD_{50}$,计算恩诺沙星对异育银鲫的安全剂量。即将健康异育银鲫随机分成 5 组,每组 10 尾进行实验,每组各 3 个平行,各组口灌恩诺沙星的剂量(药物占体重的比例)分别为:实验组 1 000 mg/kg、2 000 mg/kg、3 000 mg/kg、4 000 mg/kg,对照组 0 mg/kg(对照组口灌等体积的生理盐水)。其中,异育银鲫口灌恩诺沙星无回吐者保留实验。实验养殖用水为曝气自来水, pH 值为 6.5~7.5,水温控制在 19~21℃,实验期间不投喂任何饲料。

1.3 恩诺沙星对异育银鲫血液生化指标影响的测定 参照刘冉(2009)和汪文选等(2009)的方法,观察了恩诺沙星对异育银鲫血液生化指标的影响。即将健康异育银鲫随机分成 5 组,每组 10 尾进行实验,每组各 3 个平行,各组每天口灌恩诺沙星的剂量分别为实验组 20 mg/kg、40 mg/kg、80 mg/kg、160 mg/kg、320 mg/kg,对照组口灌等体积的无菌生理盐水。其中,异育银鲫口灌恩诺沙星无回吐者保留实验。各组连续口灌异育银鲫 30 d 后参照异育银鲫采血的方法(汪文选等 2009)取血清,采用全自动生化

分析仪利用双缩脲法和试剂盒法(文庆成等 1985,肖玉鹏等 2007,范春燕 2011)分别进行总蛋白(TP)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、 γ -谷氨酰转移酶(γ -GT)的浓度测定。实验养殖用水为曝气自来水,pH 值为 6.5 ~ 7.5,水温控制在 19 ~ 21℃,实验期间不投喂任何饲料。

1.4 统计分析方法 实验所得数据采用 SPSS 软件中的单因素方差分析(one-way ANOVA)进行统计分析,显著系数为 0.05。

2 结果

2.1 异育银鲫口灌恩诺沙星的急性毒性 实验结果表明,当恩诺沙星以 0 mg/kg、1 000 mg/kg 剂量口灌异育银鲫时,异育银鲫在 96 h 内均未出现死亡现象;当恩诺沙星以 2 000 mg/kg、3 000 mg/kg、4 000 mg/kg 剂量口灌异育银鲫时,异育银鲫出现游动缓慢、易惊等神经症状,并在 96 h 内出现不同数量的鱼体死亡。通过概率单位图解法得到的异育银鲫死亡率与恩诺沙星给药剂量对数值的关系为: $Y = 4.212X - 8.861$, $R^2 = 0.9934$ (图 1),其中, Y 表示死亡概率, X 表示口灌剂量的对数值, R^2 表示相关系数。计算出恩诺沙星对异育银鲫的 LD_{50} 为 1 949.84 mg/kg,安全浓度为 194.98 mg/kg。

2.2 恩诺沙星对异育银鲫血清生化指标的影响 恩诺沙星以 0 ~ 320 mg/kg 的剂量连续口灌异育银鲫 30 d,异育银鲫均未出现死亡,且各浓度组中异育银鲫血清总蛋白、谷丙转氨酶、谷草转氨酶和 γ -谷氨酰转移酶的含量较对照组均有所升高。具体表现在:(1)以 80 mg/kg、160 mg/kg、320 mg/kg 的剂量连续口灌异育银鲫恩诺沙星 30 d,对应各浓度组中的血清总蛋白含量分别较对照组增加了 22.17%、43.53%、72.42% ($P < 0.05$);而以 20 mg/kg、40 mg/kg 的剂量连续口灌异育银鲫恩诺沙星 30 d,对应各浓度组中的血清总蛋白含量较对照组增加了 2.33%、4.47% ($P > 0.05$)(图 2A)。(2)以 40 mg/kg、80 mg/kg、160 mg/kg、320 mg/kg 的剂量连续口灌异育银鲫恩诺沙星

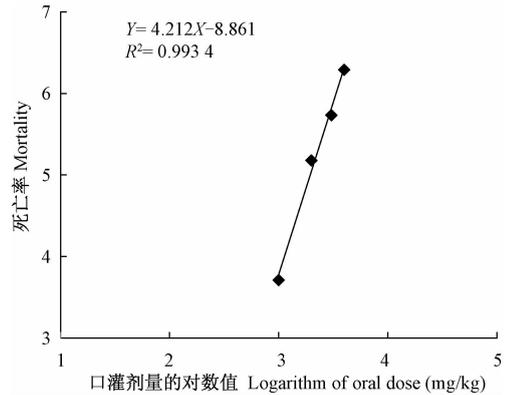


图 1 异育银鲫死亡率与恩诺沙星给药剂量的关系曲线

Fig. 1 Relation curve between enrofloxacin administration dosage (AD) and *Carassius auratus gibelio* mortality

30 d,对应各浓度组中的血清谷丙转氨酶含量分别较对照组增加了 22.62%、30.78%、46.55%、85.71% ($P < 0.05$);而以 20 mg/kg 的剂量连续口灌异育银鲫恩诺沙星 30 d,血清谷丙转氨酶含量较对照组仅升高了 7.14% ($P > 0.05$)(图 2B)。(3)以 40 mg/kg、80 mg/kg、160 mg/kg、320 mg/kg 的剂量连续口灌异育银鲫恩诺沙星 30 d,对应各浓度组中的血清谷草转氨酶的含量分别较对照组增加了 37.03%、42.78%、69.20%、86.06% ($P < 0.05$);而以 20 mg/kg 的剂量连续口灌异育银鲫恩诺沙星 30 d,血清谷草转氨酶含量较对照组仅升高了 5.32% ($P > 0.05$)(图 2C)。(4)以 160 mg/kg、320 mg/kg 的剂量连续口灌异育银鲫恩诺沙星 30 d,对应各浓度组中的血清 γ -谷氨酰转移酶含量分别较对照组增加了 14.82%、28.71% ($P < 0.05$);而以 20 mg/kg、40 mg/kg、80 mg/kg 的剂量连续口灌异育银鲫恩诺沙星 30 d,对应各浓度组中的血清 γ -谷氨酰转移酶含量较对照组仅升高了 0.53%、1.35%、7.21% ($P > 0.05$)(图 2D)。

3 讨论

恩诺沙星在异育银鲫体内的吸收迅速,除了中枢神经系统外,在各组织中均有分布(郭

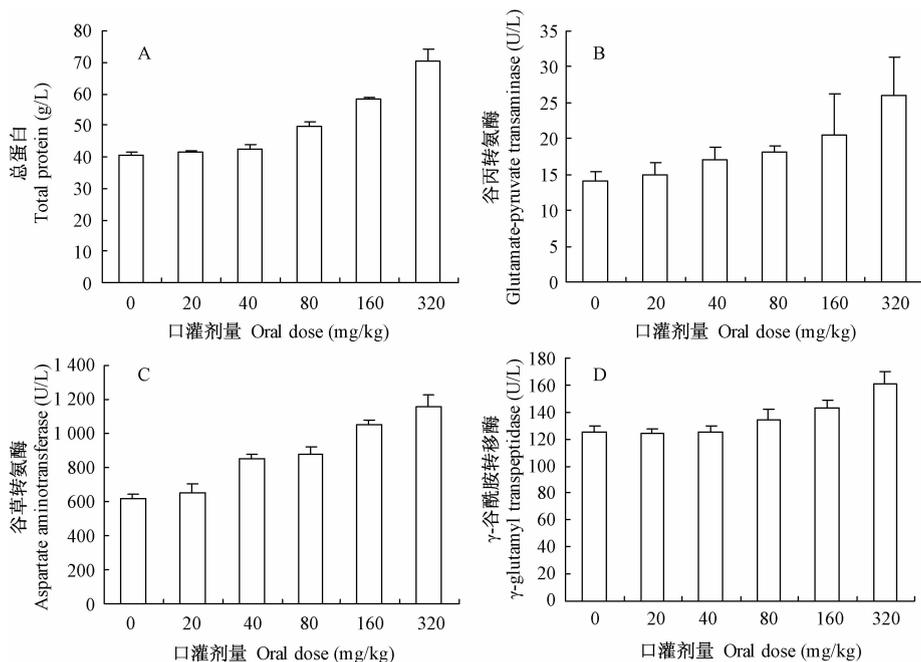


图 2 恩诺沙星对异育银鲫血清生化指标的影响

Fig. 2 Influence of enrofloxacin on the serum biochemical indicators in *Carassius auratus gibelio*

A. 恩诺沙星对血清总蛋白含量的影响; B. 恩诺沙星对血清谷丙转氨酶含量的影响; C. 恩诺沙星对血清谷草转氨酶含量的影响; D. 恩诺沙星对血清 γ -谷酰胺转移酶含量的影响

A. Influence of enrofloxacin on the content of total serum protein; B. Influence of enrofloxacin on the content of glutamate-pyruvate transaminase; C. Influence of enrofloxacin on the content of aspartate aminotransferase; D. Influence of enrofloxacin on the content of γ -glutamine transferase.

娇娇等 2011), 故对水产动物全身感染和深部组织的治疗均有较好的疗效。然而, 目前关于恩诺沙星对水产动物的毒性研究却鲜有报道。恩诺沙星对鲟鱼 (*Acipenser* sp.) (郭娇娇等 2010)、孔雀鱼 (*Poecilia reticulata*) (房英春等 2012) 以及德国框镜鲤 (*Cyprinus carpio*) (刘艳辉等 2012) 的 LD_{50} 为 1 590.36 mg/L、70 mg/L、629 mg/L。本实验结果表明, 恩诺沙星对异育银鲫的 LD_{50} 为 1 949.84 mg/kg, 与上述研究者的实验结果有所不同, 可能与恩诺沙星的给药方式、异育银鲫规格、养殖品种和环境不同有关。

肝是生物体内物质代谢的重要器官, 含有庞大的生物酶系统, 尤其是谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、 γ -谷酰胺转移酶 (γ -GT) 等转氨酶, 其在氨基酸代谢和蛋白质、脂肪、糖类三大物质转化过程中起着非常重要的作用 (赵

海鹏 2008)。然而, 一旦肝发生病变或者受到外来损伤, 生物膜的通透性变大, 细胞内酶的合成与释放发生异常, AST、ALT 和 γ -GT 被大量释放入血液中, 造成血液中酶活性的升高, 故酶的活性变化与肝细胞的变性、坏死等生理病理变化密切相关, 可以很好的反映出肝的损伤程度 (王子锡 2011)。此外, 血清中总蛋白水平也受肝糖原分解的影响, 故总蛋白的变化可间接反映肝的储备能力 (Harikrishnan et al. 2003)。因此, AST、ALT 和 γ -GT 三种酶结合血清总蛋白的指标在一定程度上可以作为衡量机体肝健康与否的重要指标, 直接或者间接反映出鱼体解毒器官——肝的变化。例如, 汪文选等 (2009) 对异育银鲫血液生化指标的研究结果表明, 5 ~ 40 mg/kg 的剂量范围下连续给药 (恩诺沙星) 5 次 (每次给药间隔时间为 24 h), 异育银鲫血清总蛋白、谷丙转氨酶、谷草转氨酶的含

量与对照组均没有明显差异,说明低浓度短期使用恩诺沙星对肝细胞不会产生损伤。本实验结果表明,恩诺沙星在 40 mg/kg 的剂量下连续给药会显著增加异育银鲫血清谷草转氨酶和谷丙转氨酶的含量,与汪文选等(2009)的研究结果有所不同。这可能与异育银鲫的规格与体质、恩诺沙星的给药方式与给药次数、养殖环境等因素有关。此外,本实验还发现恩诺沙星在 40 mg/kg 的剂量下连续给药,ALT 和 AST 较对照组显著性升高,而 γ -GT 变化不明显,这可能与这些指标在肝中的分布不同有关(李忠 1982,王金法 1983)。

据《SCT1083-2007 诺氟沙星、恩诺沙星水产养殖使用规范》,恩诺沙星在水产养殖上的推荐使用量是 10~20 mg/kg。本实验发现,使用 20 mg/kg 恩诺沙星连续口灌异育银鲫 30 d,未导致异育银鲫血清总蛋白含量、谷丙转氨酶含量、谷草转氨酶含量发生显著变化,但在不小于 40 mg/kg 的剂量连续给药时,会导致异育银鲫的谷丙转氨酶、谷草转氨酶显著升高,表明 \geq 40 mg/kg 的恩诺沙星长期连续给药很可能引起异育银鲫肝细胞受到损伤。因此,建议养殖户在异育银鲫养殖过程中将恩诺沙星的用量控制在 20 mg/kg,以免因恩诺沙星的长期连续给药对异育银鲫造成肝损伤。

参 考 文 献

- Harikrishnan R, Rani M N, Balasundaram C. 2003. Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. *Aquaculture*, 221(1/4): 41-50.
- 范春燕. 2011. 早产儿血清白蛋白、前白蛋白及总蛋白测定的临床意义. *山东医药*, 51(33): 60-61.
- 房英春, 齐跃, 李莹, 等. 2012. 盐酸环丙沙星、恩诺沙星和诺氟沙星对孔雀鱼急性毒性试验研究. *沈阳大学学报: 自然科学版*, 24(3): 15-17.
- 郭娇娇, 潘红艳, 杨虎, 等. 2011. 恩诺沙星在杂交鲟体内的药物代谢动力学. *大连海洋大学学报*, 26(4): 362-366.
- 郭娇娇, 杨虎, 潘红艳, 等. 2010. 恩诺沙星对鲟鱼的急性毒性研究. *现代农业科技*, (20): 311-312.
- 李春雨, 李继昌, 卢彤岩, 等. 2009. 不同给药方式下恩诺沙星在鲤体内的药动学研究. *集美大学学报: 自然科学版*, 14(3): 8-13.
- 李艳. 2010. 异育银鲫养殖技术. *现代农业科技*, (4): 351-351.
- 李忠. 1982. 肝脏疾病几种血清酶学检验. *中国医师进修杂志*, (2): 22-25.
- 刘冉. 2009. 复方中草药对罗非鱼血清指标和肠道菌群的影响. 湛江: 广东海洋大学硕士学位论文, 21-27.
- 刘艳辉, 祖岫杰, 李改娟, 等. 2012. 恩诺沙星对鱼类的急性毒性研究. *吉林水利*, (6): 46-47.
- 汪文选, 陈琛, 卢彤岩, 等. 2009. 恩诺沙星对鲫鱼血液生理生化指标的影响. *水产学杂志*, (4): 20-22.
- 王金法. 1983. 家畜几种常见血清酶的活性测定及其临床意义. *畜牧与兽医*, (2): 9-11.
- 王子锡. 2011. 肝胆疾病患者血清肝酶谱变化及分析. *现代中西医结合杂志*, 20(24): 3044-3045.
- 文庆成, 李学仁. 1985. 血清谷丙转氨酶连续监测法试剂盒的研制. *医学研究通讯*, (6): 182-183.
- 肖玉鹏, 吴卫平. 2007. 自动生化分析仪定量测定脑脊液总蛋白. *检验医学与临床*, (2): 116-117.
- 赵海鹏. 2008. 长江中上游几种经济鱼类的血液学研究. 重庆: 西南大学博士学位论文, 51-60.
- 朱欣欣, 万朝敏. 2011. 药物性肝损害研究进展. *中国实用儿科杂志*, 26(11): 865-867.