

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2015.140314

伊维菌素对松浦镜鲤的急性毒性与组织损伤

韩冰^{1,2}, 王荻¹, 卢彤岩¹

1. 中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070;

2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306

摘要: 分别以 1.30 mg/kg、1.69 mg/kg、2.19 mg/kg、2.86 mg/kg、3.71 mg/kg、4.83 mg/kg、6.27 mg/kg、8.16 mg/kg 剂量的伊维菌素(ivermectin)对松浦镜鲤(*Cyprinus specularis songpu*)进行口灌, 并设置空白对照和溶剂对照, 给药后连续观察 96 h, 记录各组鱼的行为和死亡情况。用 SPSS 软件计算得出松浦镜鲤口灌伊维菌素的 96 h LD₅₀ 为 4.04 mg/kg, 95%可信区间为 3.42~4.80 mg/kg。对给药组和对照组鱼进行血细胞分析, 发现随着给药剂量的增加, 红细胞数无明显变化, 血红蛋白浓度呈上升趋势, 而白细胞数呈下降趋势。通过组织切片观察, 发现伊维菌素给药剂量为 4.83 mg/kg 时松浦镜鲤体内组织开始出现明显的病理变化。大剂量口灌伊维菌素后, 松浦镜鲤肠绒毛出现坏死、脱落现象, 肝细胞萎缩、肝血窦变大, 肾小管上皮细胞变性、坏死, 心肌纤维萎缩、变性。本研究通过探讨伊维菌素对松浦镜鲤的毒性效应, 旨在为松浦镜鲤养殖过程中科学合理的使用伊维菌素提供基础数据和科学依据。

关键词: 伊维菌素; 松浦镜鲤; 急性毒性; 组织损伤

中图分类号: S948

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2015)04-0687-11

伊维菌素(ivermectin, IVM)作为一种广谱、高效的新型大环内酯类抗寄生虫药^[1], 对体内外寄生虫特别是线虫和节肢动物具有良好的驱杀作用^[2], 被认为是目前世界上最优秀的抗虫药之一^[3]。因此, 自其首次应用于大西洋鲑(*Salmo salar*)养殖过程中海虱病的防治后, 便逐步在水产养殖中得到推广使用, 现已被广泛应用于杀灭寄生在水产动物体内的线虫和节肢动物^[4-6]。虽然 IVM 对寄生虫病防治具有良好的效果, 但其安全范围较窄^[7], 使用不当极易对养殖对象造成损伤。目前关于 IVM 对鱼类毒性的研究多是集中在急性毒性实验半数致死量或致死浓度的测定上, 而 IVM 对鱼类组织病理的研究极少。且急性毒性研究仅出现在斑马鱼、虹鳟、蓝鳃太阳鱼等少量种类中^[8-9], 并多数选用静水生物测试法, 模拟了泼洒给药的方

式或将 IVM 作为水产动物养殖水体的外源污染物质对其进行生态毒性阐述。而对于 IVM 临床使用中以治疗为目的, 口灌给药方式下对鱼类的急性毒性研究仅有少数报道。

松浦镜鲤(*Cyprinus specularis songpu*)属鲤形目, 鲤科, 镜鲤属, 是中国水产科学研究院黑龙江水产所在德国镜鲤选育系 F₄ 基础上, 采用混合选择方法选育 3 代后培育出的新品种, 具有体型好、背部较高而厚、生长快、抗寒力强、繁殖力高、体表基本无鳞等特点^[10-11], 被全国水产良种审定委员会审定 为适合在中国推广的水产优良养殖品种^[12]。本文通过 IVM 对松浦镜鲤的急性毒性以及 IVM 超量使用时对松浦镜鲤组织病理变化的影响进行研究, 以期了解 IVM 对其的毒性, 从而为 IVM 在松浦镜鲤病害防控中的科学合理使用提供参考资料。

收稿日期: 2014-07-30; 修订日期: 2014-09-18.

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201203085); 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-46).

作者简介: 韩冰(1989-), 男, 硕士研究生, 从事渔药药理学与残留检测技术研究. E-mail: h_bing1022@163.com

通信作者: 卢彤岩(1967-), 研究员. E-mail: lutongyan@hotmail.com

1 材料与方法

1.1 实验鱼

松浦镜鲤体重(90.82 ± 9.12) g, 由黑龙江水产研究所呼兰水产试验站提供; 实验在自动循环水鱼缸中进行, 实验期间持续给氧, 保持水温在(20 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 。实验鱼暂养 7 d, 期间投喂全价基础饲料, 保证实验鱼适应实验条件。在正式实验开始前 24 h 停饲, 选取规格均一, 体质健康者进行实验, 实验期间不投喂。

1.2 药品与试剂

伊维菌素标准品: 含量 99.5%, 德国 Dr. Ehrenstorfer, 批号: 10506。

红细胞稀释液: 先将 5.9 g NaCl、0.25 g KCl、0.28 g CaCl_2 、0.29 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、2.1 g NaHCO_3 、1.6 g KH_2PO_4 分别用少量蒸馏水溶解, 再逐一混匀, 其中 CaCl_2 和 NaHCO_3 最后加入。混匀后用蒸馏水定容至 1 000 mL, 低温保存。

白细胞稀释液: 98 mL 蒸馏水中加入 2 mL 冰醋酸和 3 滴 1% 亚甲蓝。

氰化高铁血红蛋白检测法稀释应用液: 氰化高铁血红蛋白检测法储备液(购自南京建成生物工程研究所)用蒸馏水做 1:99 稀释, 配制成稀释应用液, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3 LD_{50} 的测定

伊维菌素口灌液均用 50% 的乙醇配制成相应浓度。正式实验前首先进行预实验, 根据预实验结果, 确定急性毒性实验的各组给药剂量。实验共设置 8 个实验组(各组给药剂量分别为 1.30 mg/kg、1.69 mg/kg、2.19 mg/kg、2.86 mg/kg、3.71 mg/kg、4.83 mg/kg、6.27 mg/kg、8.16 mg/kg)、1 个空白对照组(蒸馏水)和 1 个溶剂对照组(50%乙醇), 每组 10 尾鱼, 进行口灌给药。连续观察 96 h, 并分别记录每组实验鱼的状态、死亡时间、死亡数等信息, 计算 96 h 实验鱼的死亡率, 采用机率单位加权回归法, 通过 SPSS 软件计算得到该药在 96 h 的半数致死量(LD_{50})^[13]。

1.4 IVM 对血细胞的影响

取急性毒性实验后空白对照组、溶剂对照组和 1.69 mg/kg、2.86 mg/kg、3.71 mg/kg、4.83 mg/kg、

6.27 mg/kg 剂量组各 3 尾未死亡鱼, 进行血细胞分析, 包括红细胞数与白细胞数的测定。

红细胞数测定: 首先抽取 0.4 mL 实验鱼全血与 0.1 mL 质量浓度为 0.3% 的肝素钠混匀, 制成抗凝血。然后取 10 mL 玻璃试管, 加入 3.98 mL 红细胞稀释液, 再取抗凝血 0.02 mL(擦去吸头外面的血液)混匀, 此时为 200 倍稀释后的红细胞悬液。将盖玻片盖在计数池上, 45 度, 加入 200 倍稀释的红细胞悬液一滴, 充满计数池, 不可有气泡, 不可溢出。在低倍镜下找出红细胞计数区, 静止两分钟后, 计数。高倍物镜计数中央大方格内四角的 4 个和中央的 1 个共计 5 个中方格(每个中方格体积为 0.004 mm^3)的全部红细胞数, 计数重复 3 次, 取其平均值 R 。计算时要注意压线细胞计左不计右, 计上不计下。

每立方毫米红细胞数 = $(R \times 200) / (0.004 \times 5) = R \times 10\,000$ 。

白细胞计数: 首先抽取 0.4 mL 实验鱼全血与 0.1 mL 质量浓度为 0.3% 的肝素钠混匀, 制成抗凝血。在试管中加入白细胞稀释液 0.38 mL, 再吸取 0.02 mL 抗凝血, 擦去管外黏附的血液, 吹入试管中, 反复吹吸混匀。在计数板上加入一滴悬液, 静止 1~2 min, 低倍镜检, 计数四角 4 个大方格内的全部白细胞数, 计数重复 3 次, 取其平均值 W 。

每立方毫米白细胞数 = $(W \times 20) / (0.1 \times 4) = W \times 50$ 。

血红蛋白测定: 取稀释应用液 5 mL 加全血 0.02 mL, 回洗 3 次, 混匀后静置 5 min, 用稀释应用液调零, 540 nm, 1 cm 光径比色杯比色, 测各管吸光度值 A 。

血红蛋白克数/升 = 测得的吸光度值 $\times 367.7$ 。

1.5 组织切片制作

取急性毒性实验后, 溶剂对照组和 1.69 mg/kg、4.83 mg/kg 给药剂量组各 3 尾未死亡鱼, 以及急性毒性实验进行过程中药剂量组 8.16 mg/kg 刚死鱼, 立即分离肠、心脏、肝和肾相同部位组织, 放入 Bouin's 液中固定 24 h, 移入 70% 酒精中保存。样品经脱水、透明、石蜡包埋、连续切片, 切片厚度为 5 μm , HE 染色后, 用 Leica 显微镜观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 松浦镜鲤中毒症状

观察发现,随着给药剂量的增加,松浦镜鲤表现出 IVM 中毒症状的时间越来越早,且中毒症状也随着给药剂量的增加以及时间的推移而加深。所有给药剂量组实验鱼均出现体色发黑的情况,且随着给药剂量的增加,体色发黑的情况越加明显。除体色发黑外,2.20 mg/kg 和 2.86 mg/kg 给药剂量组实验鱼游动减少,多静止在鱼缸底部;3.71 mg/kg 给药剂量组实验鱼行动迟缓,部分鱼腹鳍部位出血,肛门红肿,解剖刚刚死亡鱼,发现肝有出血症状;4.83 mg/kg 给药剂量组部分鱼甚至出现了眼球突出或出血的状况,解剖刚死亡鱼发现肝为青色。6.27 mg/kg 给药剂量组实验鱼身体失衡倾斜,极少游动,甚至用玻璃棒触碰鱼体也无反应,解剖死亡鱼发现部分鱼肝颜色变浅,且肠道有青绿色内容物;8.16 mg/kg 给药剂量组在给药后便有多条鱼死亡,未死亡鱼静置在鱼缸底部,极少游动,最终本组所有实验鱼均死亡。

2.2 IVM 对松浦镜鲤的急性毒性效应

由表 1 可见,空白对照组、溶剂对照组与 1.30 mg/kg、1.69 mg/kg 剂量组均无实验鱼死亡,2.20 mg/kg 给药剂量组开始出现实验鱼死亡现象,并随着给药剂量的增加,死亡率逐步增加,当给药剂量达到 8.16 mg/kg 时,96 h 之内实验鱼全部

死亡。通过 SPSS 软件进行死亡率和剂量对数的 Logit 模型拟合,其拟合优度检验结果显示 $P=0.962$,说明拟合度良好。在此模型下,IVM 对松浦镜鲤 96 h LD_{50} 为 4.04 mg/kg,95%可信区间为 3.42~4.80 mg/kg。

2.3 IVM 对松浦镜鲤血细胞的影响

由图 1 可见,空白对照组、溶剂对照组和各给药剂量组中红细胞(RBC)数虽然略有波动,但差异不大,整体呈平稳趋势。2 个对照组和 1.69 mg/kg 剂量组的白细胞(WBC)数无明显差异,但是在 2.86 mg/kg 剂量组中白细胞数略有升高,随后白细胞数随着给药剂量的增加而逐渐降低,最后在 6.27 mg/kg 剂量组中白细胞数低于空白对照组。2 个对照组和 1.69 mg/kg、2.86 mg/kg 剂量组血红蛋白(HGB)浓度差异不大,而 3.71 mg/kg 剂量组的血红蛋白浓度开始升高,但是在 3.71 mg/kg 与 4.83 mg/kg 两剂量组中血红蛋白浓度出现一个平台期,随后在 6.27 mg/kg 剂量组血红蛋白浓度大幅增加并超过空白对照组。

2.4 IVM 对松浦镜鲤的组织毒理观察

2.4.1 肠 由图 2 可以看出,随着给药浓度的增加,IVM 对松浦镜鲤肠道的毒理作用逐步增强。对比 1.69 mg/kg 和溶剂对照组,发现在 1.69 mg/kg 给药剂量下,松浦镜鲤肠道形态并没有明显的病理学变化。但是在 4.83 mg/kg 剂量组,肠绒毛顶端柱状上皮细胞坏死、脱落。而口灌剂量达到 8.16 mg/kg 时,肠绒毛结构消失,肠道细胞脱落于肠腔中,单层柱状上皮细胞坏死,固有层和黏膜下层变性、萎缩。

2.4.2 肝 由图 3 可以看出,对照组中正常的肝细胞呈多角状,体积大小虽不同,但形式无甚差异;每个细胞有一个细胞核,较圆,在细胞的中心位置;细胞质有或大或小的脂泡。1.69 mg/kg 剂量组中,除在放大倍数为 1 000 倍的情况下观察到肝血窦略微扩张之外,无其他异常变化。当口灌剂量达到 4.83 mg/kg 时,肝血窦大量增加,并严重扩张、淤血,肝细胞核变大。在 8.16 mg/kg 剂量组中,肝窦变大,肝细胞出现萎缩,胞浆基质变淡,部分肝细胞溶解、细胞核消失。

表 1 口灌 IVM 96 h 后松浦镜鲤死亡率
Tab. 1 The mortality of Songpu mirror carp after oral administration of IVM for 96 h

n=10		
组别 group	剂量/(mg·kg ⁻¹) dose	死亡率/% mortality
空白对照 blank cont.	0	0
溶剂对照 solvent cont.	0	0
1	1.30	0
2	1.69	0
3	2.20	10
4	2.86	20
5	3.71	40
6	4.83	70
7	6.27	80
8	8.16	100

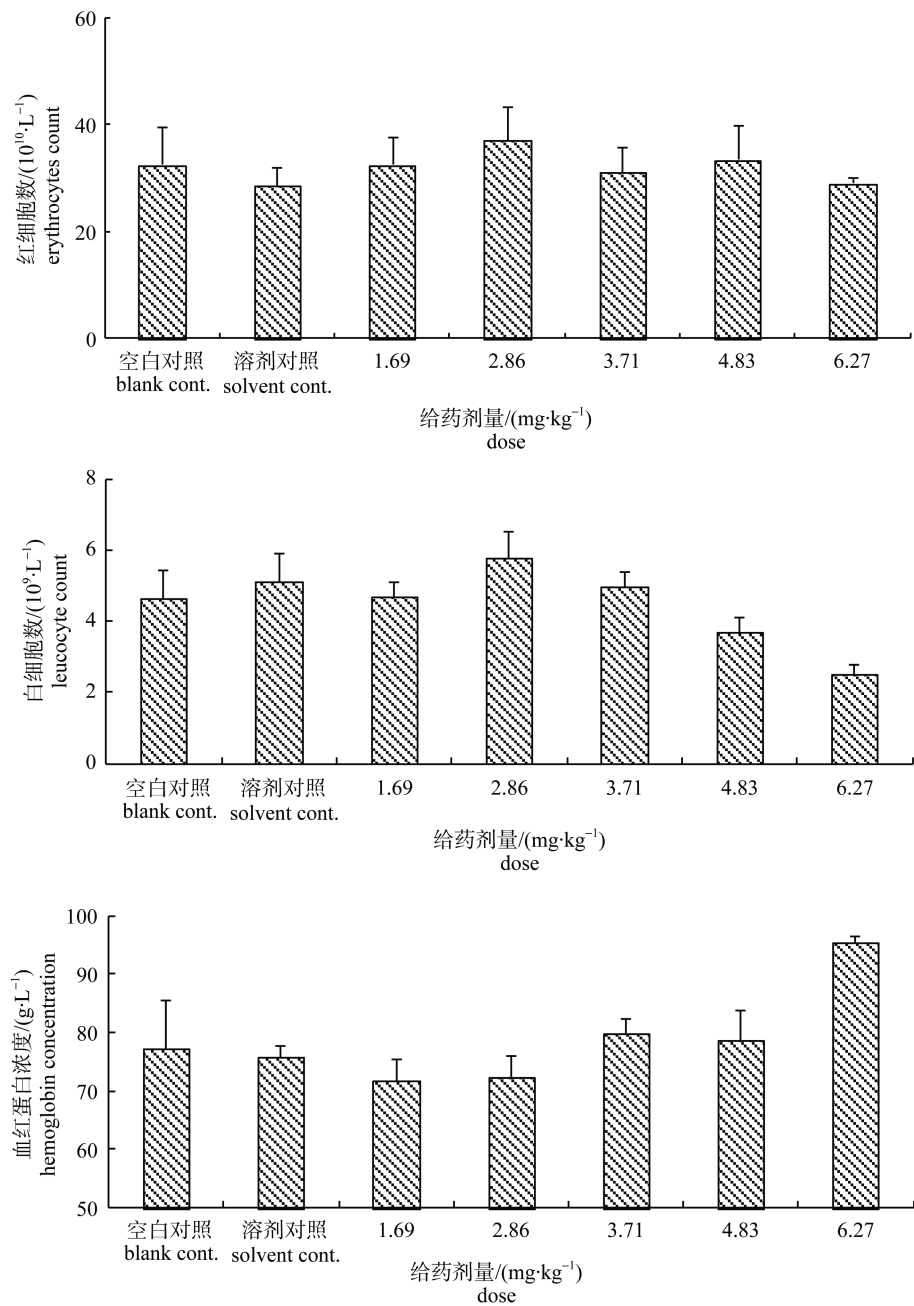


图 1 IVM 对松浦镜鲤血细胞的影响

Fig. 1 Influence of IVM on the blood cells in Songpu mirror carp

2.4.3 肾 由图 4 可以看出, 1.69 mg/kg 剂量组实验鱼肾脏较溶剂对照组无明显的病理变化。而在 4.83 mg/kg 剂量组, 开始出现炎症细胞的浸润, 部分肾小管上皮细胞变性、坏死等现象。当口灌剂量达到 8.16 mg/kg 时, 出现大量的炎症细胞浸润, 肾间质细胞坏死, 肾小管上皮细胞变性、坏死, 肾小管管状结构几近消失。

2.4.4 心 由图 5 可以看出, 溶剂对照组心肌纤维饱满, 分布均匀。1.69 mg/kg 剂量组中, 松浦镜鲤心肌纤维在给药 96 h 后出现了略微的萎缩。当剂量达到 4.83 mg/kg 时, 心肌纤维空泡化变性严重, 肌间隙内炎症细胞浸润。而在 8.16 mg/kg 剂量组中, 心肌纤维严重萎缩, 部分心肌纤维溶解, 并且出现核固缩现象。

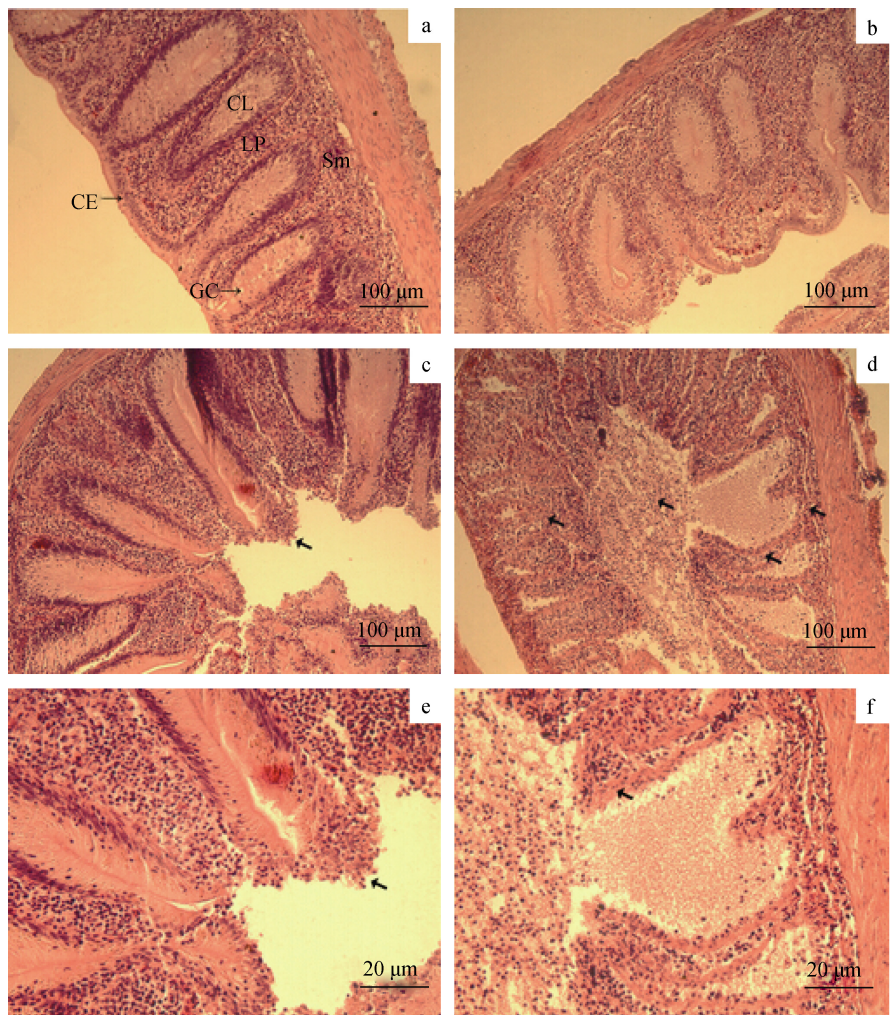


图 2 松浦镜鲤肠的组织病理变化

CE: 单层柱状上皮; CL: 隐窝; GC: 杯状细胞; LP: 固有层; Sm: 黏膜下层。
a: 对照组, 肠壁形态完整; b: 1.69 mg/kg 剂量组, 肠壁形态完整; c: 4.83 mg/kg 剂量组, 肠绒毛顶端柱状上皮细胞坏死、脱落; d: 8.16 mg/kg 剂量组, 肠绒毛消失, 肠道细胞脱落于肠腔中, 固有层和黏膜下层变性、萎缩; e: 4.83 mg/kg 剂量组, 肠绒毛顶端柱状上皮细胞坏死、脱落; f: 8.16 mg/kg 剂量组, 单层柱状上皮细胞坏死。

Fig. 2 Histopathologica changes in the intestinal tissues

CE: columnar epithelium; CL: intestinal crypt; GC: goblet cell; LP: lamina porpria; Sm: submucosa.
a: control group, the intestinal morphology had intact structure; b: dose group of 1.69 mg/kg, the intestinal morphology had intact structure; c: dose group of 4.83 mg/kg, necrosis cells of columnar epithelium on intestinal villus tip fell off; d: dose group of 8.16 mg/kg, intestinal villi disappeared, intestinal cells shed into the intestine, lamina porpria and submucosa degenerated, atrophied; e: Dose group of 4.83 mg/kg, necrosis cells of columnar epithelium on intestinal villus tip fell off; f: Dose group of 8.16 mg/kg, columnar epithelium cells were necrosed.

3 讨论

3.1 IVM 的急性毒性效应

由于 IVM 安全范围比较狭窄, 因此准确控制给药量非常重要。急性毒性实验可以为药物安全给药量的确定提供有效数据。本研究表明, IVM 对体重为 90 g 左右的松浦镜鲤 96 h LD₅₀ 为 4.04 mg/kg,

以公式: 安全剂量=0.1×LD₅₀ 计算^[14], IVM 对松浦镜鲤的安全剂量为 0.40 mg/kg。根据联合国世界卫生组织(WHO)外来化合物急性毒性分级标准, IVM 对实验鱼应属于高毒化合物。松浦镜鲤对 IVM 中毒的临床症状包括体色发黑, 游动迟缓, 身体失衡, 腹鳍部位出血, 肛门红肿等。Palmer

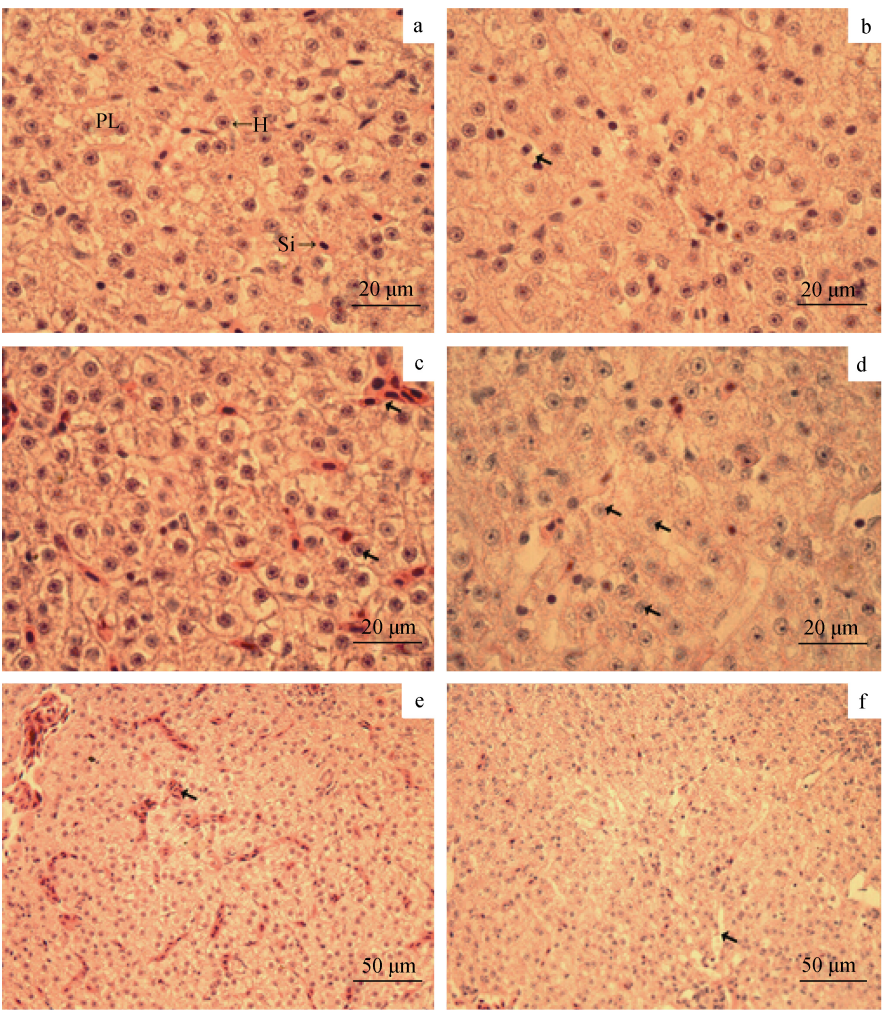


图 3 松浦镜鲤肝的组织病理变化

H: 肝细胞; PL: 肝细胞板; Si: 血窦.
a: 对照组, 正常肝细胞呈多角状; b: 1.69 mg/kg 剂量组, 肝血窦扩张; c: 4.83 mg/kg 剂量组, 肝细胞核变大, 肝血窦扩张, 淤血;
d: 8.16 mg/kg 剂量组, 肝细胞萎缩, 胞浆基质变淡, 部分肝细胞溶解、细胞核消失; e: 4.83 mg/kg 剂量组, 肝血窦
大量扩张, 淤血; f: 8.16 mg/kg 剂量组, 肝窦变大.

Fig. 3 Histopathologica changes in the liver tissues

H: hepatocyte; PL: hepatocyte plate; Si: sinusoid.
a: control group, normal hepatocyte showed multiple angular; b: dose group of 1.69 mg/kg, hepatic sinusoid dilated; c: dose group of
4.83 mg/kg, hepatocyte nucleus became large, hepatic sinusoid expanded and congested; d: dose group of 8.16 mg/kg, hepatocyte
atrophied, cytoplasmic matrix faded, partial hepatocyte lysed, nucleus disappeared; e: dose group of 4.83 mg/kg,
hepatic sinusoid expanded and congested; f: dose group of 8.16 mg/kg, hepatic sinusoid expanded.

等^[15]报道, IVM 中毒的大西洋鲑出现了食欲降低, 体色发黑, 行动迟缓等症状; Toovey 等^[16]报道 IVM 中毒后临近死亡的虹鳟会出现不稳定的游动行为以及失衡环绕游动, 鳃部呼吸受影响等症状。由此可见不同种类的鱼可以出现相似的 IVM 中毒症状。而各种实验鱼类在 IVM 中毒后出现的运动失调, 则与 IVM 的神经毒性作用有关^[17]。

给药方式的选择对药物毒性研究结果有极大影响^[18]。IVM 在水产养殖中的给药途径主要包括泼洒和口灌两种。目前, IVM 对水生动物的毒性研究, 多是采用静水生物测试法, 研究其对各种水生生物的 LC₅₀, 这主要是模拟了药物通过泼洒给药或其他方式进入水生生物生存水域。采用静水生物测试法进行研究的缺陷在于随着实验的

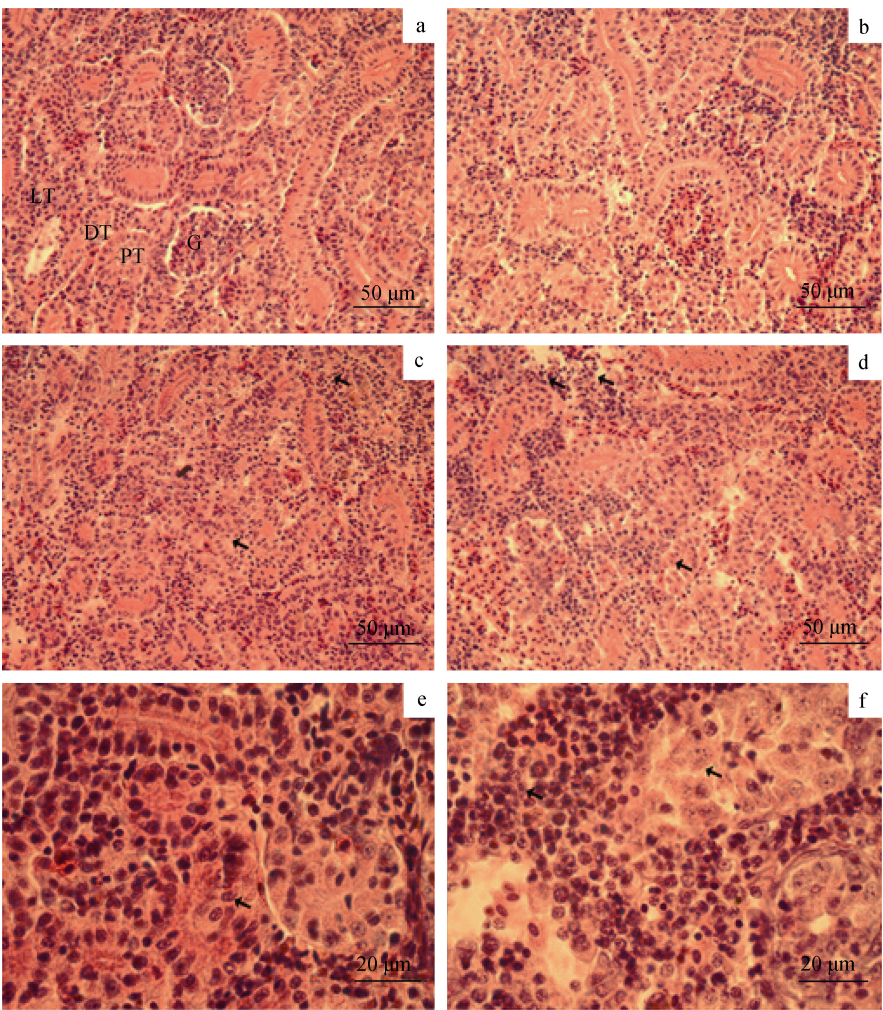


图 4 松浦镜鲤肾的组织病理变化

DT: 远曲小管; LT: 拟淋巴组织; PT: 近曲小管; G: 肾小球.

a: 对照组; b: 1.69 mg/kg 剂量组, 无明显病变; c: 4.83 mg/kg 剂量组, 出现炎症细胞, 部分肾小管上皮细胞变性、坏死; d: 8.16 mg/kg 剂量组, 出现大量炎症细胞, 肾间质细胞坏死, 肾小管管状结构几近消失; e: 4.83 mg/kg 剂量组, 肾小管上皮细胞变性、坏死; f: 8.16 mg/kg 剂量组, 肾小管上皮细胞变性、坏死.

Fig. 4 Histopathologica changes in the kidney tissues

DT: distal convoluted tubule; LT: lymphoid tissue; PT: proximal convoluted tubule; G: glomerulus.

a: control group; b: dose group of 1.69 mg/kg, no significant lesions; c: dose group of 4.83 mg/kg, inflammation cells appeared, part of renal tubular epithelial cells degenerated, necrosed; d: dose group of 8.16 mg/kg, a large number of inflammation cells appeared, renal interstitial cells necrosed, the tubular structure of renal tubule almost disappeared; e: dose group of 4.83 mg/kg, renal tubular epithelial cells degenerated, necrosed; f: dose group of 8.16 mg/kg, the tubular structure of renal tubule almost disappeared.

进行, 药物会在受试鱼体内不断的蓄积, 因此无法得知能够对鱼造成各种影响时, 药物在体内的总蓄积量。通过口灌给药方式进行鱼类的急性毒性实验, 可以有效弥补静水生物测试法的不足。目前仅有少数学者对水生动物口灌 IVM 的毒理学进行了研究; Athanassopoulou 等^[19]研究了口灌 IVM 对 11℃和 20℃下体重为 3 g 以及 11℃下体重

为 35 g 的欧洲狼鲈的毒性, 其 96 h 的 LD₅₀ 分别为 0.335 mg/kg、0.839 mg/kg 和 0.523 mg/kg; Kilmartin 等^[20]研究结果显示, 体重为 50 g 的大西洋鲑在 11℃左右水温时 96 h 的 LD₅₀ 为 0.5 mg/kg。由此可见随着水温和鱼发育程度的增加, 鱼类对 IVM 毒性的抵抗力会相应增加。本实验中, 松浦镜鲤作为一种淡水养殖鱼类, IVM 对其 96 h 的

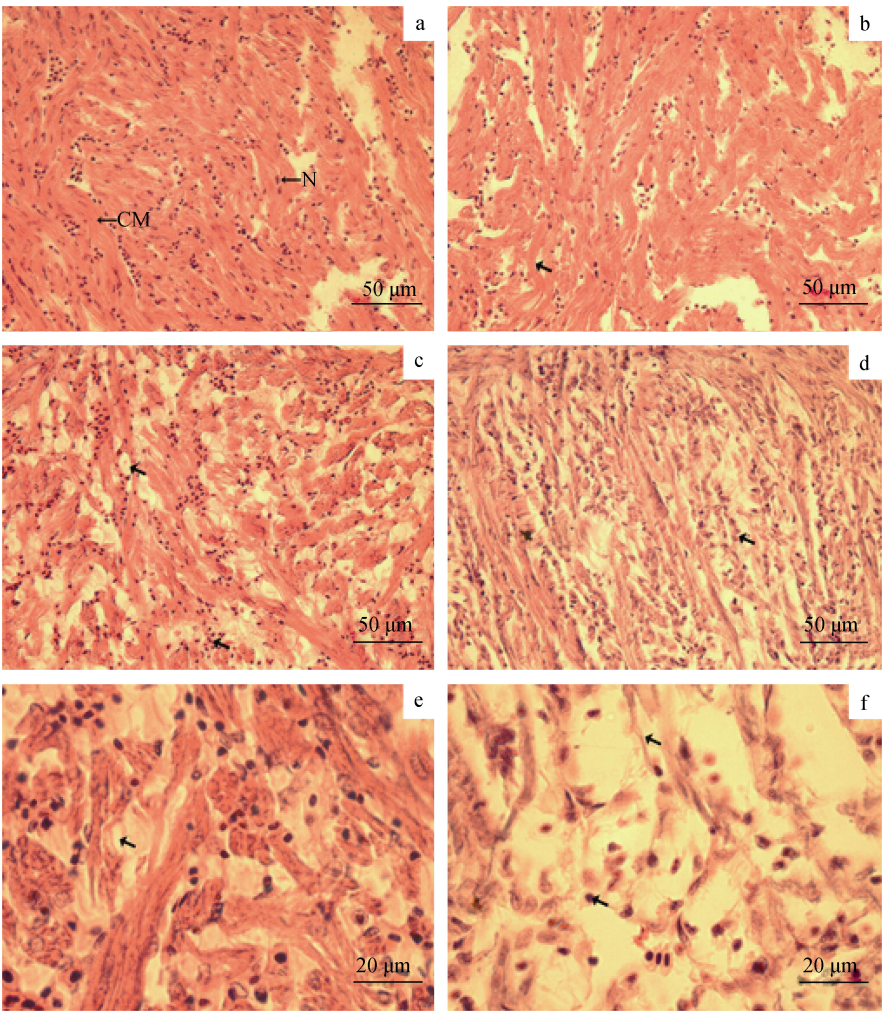


图 5 松浦镜鲤心脏的组织病理变化
CM: 心肌纤维; N: 细胞核。

a: 对照, 心肌纤维饱满; b: 1.69 mg/kg 剂量组, 心肌纤维萎缩; c: 4.83 mg/kg 剂量组, 心肌纤维空泡化变性, 炎症细胞浸润; d: 8.16 mg/kg 剂量组, 心肌纤维严重萎缩; e: 4.83 mg/kg 剂量组, 心肌纤维空泡化变性; f: 8.16 mg/kg 剂量组, 心肌纤维溶解, 核固缩。

Fig. 5 Histopathologica changes in the heart tissues
CM: cardiac muscle fiber; N: nucleus.

a: control group, cardiac muscle fiber were plump; b: dose group of 1.69 mg/kg, cardiac muscle fiber atrophied; c: dose group of 4.83 mg/kg, cardiac muscle fiber vacuolar degenerated, inflammatory cells infiltration were infiltrated; d: dose group of 8.16 mg/kg, cardiac muscle fiber atrophied seriously; e: dose group of 4.83 mg/kg, cardiac muscle fiber vacuolar degenerated; f: dose group of 8.16 mg/kg, cardiac muscle fiber dissolved, karyopyknosis.

LD₅₀ 为 4.04 mg/kg, 远大于 Athanassopoulou 等^[9]和 Kilmartin 等^[20]的相关研究结果。虽然体重和养殖条件的不同是造成结果差异的因素, 但是通过对比数据以及参考张彤等^[21]指出的同一毒物对相同大小不同种鱼类的毒性存在差异的观点, 认为实验鱼种类的不同仍是造成 IVM 对不同鱼类 96 h LD₅₀ 差异的决定性因素。这是由于各种鱼类

的生理机能、特点以及进化程度的不同, 从而导致同一毒物的敏感性存在一定的差异^[22]。

3.2 IVM 对松浦镜鲤组织的损伤

红细胞和白细胞作为血液中的主要功能性细胞, 对维持鱼类的正常生命活动起到至关重要的作用。红细胞数和血红蛋白浓度是与红细胞相关的重要参数。Katharios 等^[23]以 0.8 mg/kg 的剂量

对海鲷腹腔注射 IVM, 发现红细胞数和血红蛋白浓度与对照组相比无明显变化。彭章晓等^[16]的研究结果也显示, 通过对鲫口灌不同浓度的 IVM 溶液, 红细胞数和血红蛋白浓度无明显的变化。本实验中, 同样发现 IVM 对鱼类红细胞无显著影响。但当给药剂量达到 3.71 mg/kg 时, 血红蛋白浓度开始升高, 并在 6.27 mg/kg 剂量组中达到各测试组的最高水平, 在红细胞数水平几乎不变的情况下, 血红蛋白量的增加需要我们继续研究。

白细胞数是与白细胞相关的参数。本实验中白细胞数在 1.69 mg/kg 剂量组中与两个对照组几乎相同, 当给药剂量达到 2.86 mg/kg 时, 白细胞数略微增加, 但是随后便开始随着给药剂量的增加而降低。Katharios 等^[23]研究发现, IVM 能使海鲷的淋巴细胞和单核细胞数量上升, 他们认为这是海鲷对 IVM 的一种免疫应激反应。而彭章晓等^[17]的研究并没有发现 IVM 对鲫总白细胞数有明显影响。这两种结果与本实验结果均不相同。出现本实验这种结果的原因, 推测是因为当 IVM 给药剂量超过一定限值时, 并且随着给药剂量的大幅增加, IVM 开始对松浦镜鲤的免疫系统造成破坏, 进而影响白细胞的产生, 从而造成白细胞数的不断降低。

由组织切片结果可以看出, 在 1.69 mg/kg 给药剂量下, 松浦镜鲤肠、肝、肾、心肌等组织较对照组并无明显的病理变化, 但是随着给药剂量的增加, IVM 对松浦镜鲤以上各组织的损伤开始逐渐加重。当给药剂量达到 4.83 mg/kg 时, 松浦镜鲤肠、肝、肾、心肌组织中均发现了明显的病理学变化, 尤其以肝和心脏最为明显。肝作为机体的主要代谢器官, 心脏作为血液循环系统的动力器官, 均具有丰富的血液供应, 这也使血液中的 IVM 更易在这两种器官中积累而造成相对其他器官更为严重的损伤。在 8.16 mg/kg 剂量组, 通过松浦镜鲤 4 种器官的组织切片可以看出, 高浓度的 IVM 对这些组织损伤均非常严重, 据此推测, 对于各种功能器官的损伤, 有可能是造成实验鱼快速死亡的直接原因。

4 结论

作为一种新型广谱、高效的抗生素类抗寄生虫药, IVM 对体内外寄生虫特别是线虫和节肢动物具有良好的驱杀作用。但是由于 IVM 对水生生物的 96 h LD₅₀ 值较低, 导致其安全范围较窄, 因此必须严格按照指导剂量使用。本实验中, 通过计算得到 IVM 对松浦镜鲤的 96 h LD₅₀ 为 4.04 mg/kg, 安全浓度为 0.40 mg/kg; 而实际观测发现给药剂量不超过 1.69 mg/kg 时, IVM 对松浦镜鲤的行为以及组织生理不会造成明显影响。因此, 我们可将 0.40~1.69 mg/kg 作为一个剂量缓冲范围, 但仍建议在松浦镜鲤寄生虫病防治过程中, IVM 的使用剂量不要超过 0.40 mg/kg, 此剂量下, IVM 在能够驱杀体内外寄生虫的同时, 对松浦镜鲤是安全的。

参考文献:

- [1] Ômura S. Ivermectin: 25 years and still going strong[J]. Int J Antimicrob Ag, 2008, 31(2): 91-98.
- [2] Chen Z L. Veterinary Pharmacology[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2002: 268.[陈杖榴. 兽医药理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 268.]
- [3] Fu H L, Wu L. Studies on preparation and quality control of ivermectin liposomes[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2005, 25(6): 102-104.[符华林, 吴蕾. 伊维菌素脂质体的制备及质量控制研究[J]. 动物医学进展, 2005, 25(6): 102-104.]
- [4] Hoy T, Horsberg T E, Nafstad I. The disposition of ivermectin in Atlantic salmon (*Salmo salar*)[J]. Pharmacol Toxicol, 1990, 67(4): 307-312.
- [5] Katharios P, Iliopoulou-Georgudaki J, Antimisariis S, et al. Pharmacokinetics of ivermectin in sea bream, *Sparus aurata* using a direct competitive ELISA[J]. Fish Physiol Biochem, 2002, 26(2): 189-195.
- [6] Halley B A, Jacob T A, Lu A Y H. The environmental impact of the use of ivermectin: environmental effects and fate[J]. Chemosphere, 1989, 18(7): 1543-1563.
- [7] Zhu X J, Li Y Q, Hou B, et al. Preparation and quality evaluation of ivermectin liposome[J]. Journal of Northwest A & F University (Nat. Sci. Ed.), 2010, 29(4): 24-30.[朱晓娟, 李引乾, 侯勃, 等. 伊维菌素脂质体的制备及其质量评价[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2010, 29(4): 24-30.]
- [8] Wu H, Jiang M, Zhang Z X, et al. Research on the degradation of ivermectin and its acute toxicity to seven aquatic or-

- ganisms[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2012, 36(5): 965–970.[吴昊, 江敏, 彭章晓, 等. 伊维菌素在环境中的降解及其对七种水生生物的急性毒性研究[J]. 水生生物学报, 2012, 36(5): 965–970.]
- [9] Jiang M, Zhang Z X, Wu H, et al. Application of ivermectin in aquaculture and corresponding aqua-ecosystem risk[J]. Fishery Modernization, 2008, 35(4): 47–50.[江敏, 彭章晓, 吴昊, 等. 伊维菌素在水产养殖中的应用及其水生态风险[J]. 渔业现代化, 2008, 35(4): 47–50.]
- [10] Min X, Jia Z Y, Li C T, et al. Correlation analysis of microsatellite DNA markers with three phenotypic characters of Songpu Mirror Carp[J]. Genomics and Applied Biology, 2011, 30(2): 197–203.[闵霞, 贾智英, 李池陶, 等. 微卫星分子标记与松浦镜鲤3个表型性状的相关分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2011, 30(2): 197–203.]
- [11] Xu M, Yang J, Jiang H F, et al. Effects of NaCl salinity and NaHCO_3 alkalinity on the sperm motility and fertilization rate of *Cynipus carpio*, *Carassius auratus gibelio* and *Barbus capito*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(4): 720–728. [徐敏, 杨建, 姜海峰, 等. NaCl 盐度和 NaHCO_3 碱度对鲤、鲫和大鳞鲃的精子活力及其受精率的影响[J]. 中国水产科学, 2014, 21(4): 720–728.]
- [12] Zhou Z Y, Luo Y K, Lu H, et al. Study on the quality change of Songpu mirror carp (*Cyprinus carpio*) during 0°C ice and refrigerated storage[J]. Journal of China Agricultural University, 2012, 17(4): 135–139.[周忠云, 罗永康, 卢涵, 等. 松浦镜鲤 0°C 条件下冰藏和冷藏的品质变化规律[J]. 中国农业大学学报, 2012, 17(4): 135–139.]
- [13] Zhou Y P. The calculation of LD_{50} in new drugs with software SPSS[J]. Progress in Pharmaceutical Sciences, 2003, 27(5): 314–316.[周一平. 用 SPSS 软件计算新药的 LD_{50} [J]. 药学进展, 2003, 27(5): 314–316.]
- [14] Zhao L, Cao H P, Chen H, et al. Acute toxicity of enrofloxacin to *Carassius auratus gibelio* and its effects on blood biochemical indexes[J]. Chinese Journal of Zoology, 2013, 48(3): 446–450.[赵蕾, 曹海鹏, 陈辉, 等. 恩诺沙星对银鲫急性毒性及血液生化指标的影响[J]. 动物学杂志, 2013, 48(3): 446–450.]
- [15] Palmer R, Coyne R, Daney S, et al. Case notes on adverse reactions associated with ivermectin therapy of Atlantic salmon[J]. Bull Europ Assoc Fish Patholog, 1996, 17: 62–67.
- [16] Toovey J P G, Lyndon A R, Duffus J H. Ivermectin inhibits respiration in isolated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) gill tissue[J]. B Eur Associ Fish Pat, 1999, 19(4): 149–152.
- [17] Pang Z X, Jiang M, Wu H, et al. Preliminary study on the influence of ivermectin on blood component of *Carassius auratus*[J]. Freshwater Fisheries, 2012, 42(1): 93–96.[彭章晓, 江敏, 吴昊, 等. 伊维菌素对鲫血液成分影响的初步研究[J]. 淡水渔业, 2012, 42(1): 93–96.]
- [18] Yao J, Zhou D G, Ai X H, et al. The acute and subacute toxicities test of praziquantel on *Carassius auratus* by different administrations[J]. Freshwater Fisheries, 2008, 38(1): 35–39.[姚静, 周定刚, 艾晓辉, 等. 吡喹酮不同给药方式对鲫的急性和亚急性毒性研究[J]. 淡水渔业, 2008, 38(1): 35–39.]
- [19] Athanassopoulou F, Ragias V, Roth M, et al. Toxicity and pathological effects of orally and intraperitoneally administered ivermectin on sea bass *Dicentrarchus labrax*[J]. Dis Aqu Org, 2002, 52(1): 69–76.
- [20] Kilmartin J, Cazabon D, Smith P. Investigations of the toxicity of ivermectin for salmonids[J]. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists (United Kingdom), 1997, 17: 58–62.
- [21] Zhang T, Jin H J. Monitoring acute toxicity of four pollutants with eight fresh-water fish[J]. Environmental Monitoring in China, 1997, 13(1): 31–34.[张彤, 金洪钧. 用八种淡水鱼类监测四种污染物的急性毒性[J]. 中国环境监测, 1997, 13(1): 31–34.]
- [22] Wang X Z, Lu H D. Acute toxic effect of abamectin on fresh-water aquatic animals[J]. Journal of Environment and Health, 2009, 26(7): 593–597.[王锡珍, 陆宏达. 阿维菌素对几种淡水水生动物的急性毒性作用[J]. 环境与健康杂志, 2009, 26(7): 593–597.]
- [23] Katharios P, Iliopoulou-Georgudaki J, Kapata-Zoumbos K, et al. Toxicity of intraperitoneally injected ivermectin in sea bream, *Sparus aurata*[J]. Fish Physiol Biochem, 2001, 25(2): 99–108.

Acute toxicity and tissue injury studies of ivermectin for Songpu mirror carp (*Cyprinus specularis songpu*)

HAN Bing^{1,2}, WANG Di¹, LU Tongyan¹

1. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: In order to evaluate the toxic effects of ivermectin for Songpu mirror carp, the acute toxicity and tissue injury of ivermectin for Songpu mirror carp was studied. Ivermectin was given by oral administration to Songpu mirror carp at the dosage of 1.30 mg/kg, 1.69 mg/kg, 2.19 mg/kg, 2.86 mg/kg, 3.71 mg/kg, 4.83 mg/kg, 6.27 mg/kg, 8.16 mg/kg respectively. Blank control and solvent control were sited also. After given ivermectin, the fish were investigated in 96 h; the dead fish were sacrificed at once. Through calculating by SPSS, the 96h LD₅₀ and 95% confidence of LD₅₀ of ivermectin for Songpu mirror carp were 4.04 mg/kg and 3.42~4.80 mg/kg, respectively. The results show that with the increase of the dose, the number of red blood cells had no obvious change, the hemoglobin concentration had risen and the white blood cell count had decreased, according to analysis blood cell of the administration group and the control group. By histological examination, the results show that at the dose of 4.83 mg/kg after oral administration of ivermectin, the tissues of Songpu mirror carp began to appear obvious pathological changes. Large doses of ivermectin after oral administration, the intestinal villis became necroticed and shed in intestinal cavity, liver cells were atrophied and hepatic sinusoid became larger, tubular epithelial cells became degeneration and necrosis, myocardial fibers became atrophy and degeneration. This study provided some important reference data and theoretical basis for using ivermectin in the process of Songpu mirror carp cultivating.

Key words: ivermectin; Songpu mirror carp; acute toxicity; tissue injury

Corresponding author: LU Tongyan. E-mail: lutongyan@hotmail.com