

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2015.15021

诺氟沙星在西伯利亚鲟体内蓄积规律及其对组织的病理损伤

王荻¹, 李绍戌¹, 冯娟^{2,3}, 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. 中国水产科学研究院 南海水产研究所, 广东 广州 510300;

3. 农业部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东 广州 510300

摘要: 为了确定诺氟沙星在鲟养殖中的科学使用方法, 对不同剂量、不同给药次数情况下诺氟沙星在西伯利亚鲟(*Acipenser baerii*)体内蓄积规律及毒性进行了研究。分别以 0、30 mg/kg、50 mg/kg、100 mg/kg 的剂量对西伯利亚鲟连续口灌诺氟沙星 3~5 d, 每天 1 次, 并于停药后 24 h 及 240 h 采集实验鱼血、肝、肾及软骨组织, 对 4 种组织中药物蓄积量进行测定, 并对肝、肾和软骨组织进行切片观察。实验结果表明: 随着给药剂量增加、给药次数增多, 实验鱼 4 种组织中诺氟沙星浓度逐渐升高, 浓度由高到低依次为: 肾、软骨、肝、血清, 且血清中药物浓度远远低于另外 3 种组织。相同给药剂量、不同给药次数时血清中药物浓度无显著差异; 而肝、肾和软骨中均差异显著, 停药 240 h 后, 显著性消失。切片结果表明, 50 mg/kg 剂量连续给药 5 d 后, 实验鲟肝、肾组织开始结构损伤变化, 100 mg/kg 剂量连续给药 3~5 d 后, 损伤情况持续加重, 停药 240 h 后, 肝组织损伤情况有逐渐恢复趋势, 而肾组织未见明显恢复趋势; 而 100 mg/kg 连续给药 3~5 d 后, 软骨组织出现软骨膜内层细胞减少; 停药 240 h 后有恢复趋势。研究结果表明, 诺氟沙星在鲟中使用剂量应小于 50 mg/kg, 连续给药次数低于 5 次, 以避免对鲟肝组织造成损伤, 引起肾不可逆损伤及影响软骨细胞发育和再生, 对软骨组织造成潜在影响。

关键词: 诺氟沙星; 西伯利亚鲟; 蓄积规律; 毒性

中图分类号: S948

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2015)06-1209-10

诺氟沙星(norfloxacin, NFLX)是吡酮酸衍生物(pyridonecarboxylic acid, PCAs)^[1], 为第三代喹诺酮类代表药物之一^[2], 具有抗菌谱广、抗菌力强、无交叉耐药性等特点^[3-4], 被广泛用于人类^[5]及动物^[6]多种细菌性疾病的防治中; 近年来, NFLX 在鱼类细菌性疾病防治中的应用也日渐增多^[7-9]。目前, 关于 NFLX 在水生动物体内药物代谢动力学^[10]、残留^[11]、药物对机体内酶活性的影响^[12]、以及药物在不同类型土壤及沉积物中的吸附、解吸附^[13-14]方面都有许多研究报道。而该药对水产养殖动物毒性方面的研究多集中在急性毒性^[15-16]方面, 组织损伤方面的系统研究极度匮乏^[11, 17]。

西伯利亚鲟(*Acipenser baerii*)隶属于辐鳍鱼

纲(Actinopterygii), 软骨硬鳞亚纲(Chondrostei), 鲟形目(Acipenseriformes), 鲟科(Acipenseridae), 因具有生长快、抗病力强、易驯化等优点, 已成为中国鲟养殖业的主要养殖鱼类之一, 具有较高的科研及生产价值^[18]。喹诺酮类药物具有广谱、高效等优点^[1], 且对淡水鱼源细菌具有较好的敏感性^[19], 因而在鲟病害防控中有较广泛的应用。但养殖生产中发现喹诺酮类药物使用后, 偶尔会引起鱼体脊柱形态异常, 甚至出现“S”形弯曲导致机体发育受阻, 其致畸原因与药物的不当使用(包括药物用量及给药次数等)是否相关尚不明。吴永魁等^[20]研究表明, NFLX 对软骨组织有较强的亲和力, 可在鲤软骨组织中大量蓄积并造成

收稿日期: 2015-01-16; 修订日期: 2015-03-31.

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201203085); 农业部南海渔业资源开发利用重点实验室开放基金项目(LSF2011-08).

作者简介: 王荻(1980-), 女, 助理研究员, 从事鱼类病害及免疫研究. E-mail: wangdi_2014@163.com

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

难以恢复性损伤。目前, 鲟软骨切片研究极少^[21], 尚未见到软骨损伤及修复机制方面的报道。

本研究通过研究不同给药剂量、不同给药次数对西伯利亚鲟口灌 NFLX 后药物在鱼体组织中的蓄积及对肝、肾、软骨组织的损伤情况, 以期了解 NFLX 在鲟体内的蓄积规律及毒性, 从而为该药在鲟病害防控中的科学合理使用提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 实验鱼与试剂

健康、非免疫状态下西伯利亚鲟体重(150.00 ± 10.12) g, 购自中国水产科学研究院鲟鱼繁育技术工程中心; 实验在自动循环水鱼缸中进行, 保持水温(22.0 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$, 实验期间持续供氧。

诺氟沙星标准品: 含量 99.5%, 德国 Dr. Herenstorfer GmbH, 批号: C15648000。

诺氟沙星原粉: 含量 98%, 购自河南汇杰科创动物药业有限公司, 批号 20080418。

乙腈和正己烷(德国, Merck)为色谱纯, 其他试剂和药品均为分析纯。

1.2 实验设计及样品采集

实验用西伯利亚鲟 80 尾, 随机分为 8 组, 每组 10 尾, 根据《新编渔药手册》用药标准^[22]制定给药方案, 分别设对照组, 低剂量, 中剂量和高剂量给药组(按照 0、30 mg/kg、50 mg/kg、100 mg/kg 剂量)进行连续口灌给药, 少次给药(连续 3 d)的实验组依次编号为 A、B、C 和 D 组, 多次给药(连续 5 d)的实验组依次编号为 E、F、G 和 H 组, 其中 A 和 E 组为对照组。分别于停药 24 h 和 240 h 采集实验鱼血液、肝、肾和软骨组织。用注射器自实验鱼尾静脉处取血, 并于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 4000 r/min 离心 10 min, 取上层血清, 用于检测。

1.3 高效液相色谱条件及样品处理

采用美国安捷伦 Agilent 1100 型高效液相色谱仪, 参照陈琛等^[10]建立的方法对采集的组织样品中的 NFLX 含量进行测定。所得数据经 Excel 处理作图, 双因素回归分析由 R 软件进行计算。

1.4 组织切片制作

随机选取每组 3 尾未死亡鱼, 采集其肝、肾和软骨相同部位组织, 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 4000B 型显微镜观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 实验鱼死亡率

观察发现, 给药及后续采样期间, 对照组(A 和 E 组)实验鱼游动、进食、体色及剖检均无异常。B、C、F 和 G 组实验鱼死亡率为 0; D 组在连续给药 3 d 后开始出现死亡, 至实验结束累积死亡率 20%; H 组在连续给药 3 d 后开始出现死亡, 至 5 d 给药结束死亡率为 50%, 至采样结束(即停药 10 d 后)累计死亡率 70%。

2.2 NFLX 在实验鱼组织中蓄积情况

将实验鱼血清、肝、肾和软骨组织进行前处理^[10], 经高效液相色谱检测, 结果表明, 对照组实验鱼 4 种组织中均无 NFLX 检出, 其他各实验组结果如下图所示:

由图 1 可见, 随着给药剂量增加、给药次数增多, 实验鱼 4 种组织中 NFLX 浓度逐渐升高。4 种组织中药蓄积浓度一致表现为: 肾>软骨>肝>血清, 且血清中药物浓度远远小于另外 3 种组织。图中显示, 随着不同剂量、不同次数给药 4 种组织中的药物蓄积浓度呈现相同的增加趋势, 但不

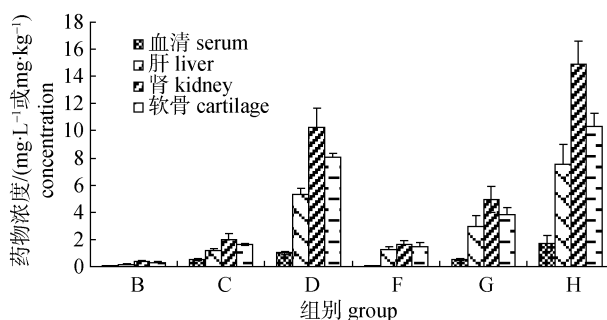


图 1 西伯利亚鲟口灌诺氟沙星停药 24 h 残留检测结果
B、C、D 组分别为 30 mg/kg、50 mg/kg、100 mg/kg 剂量连续给药 3 d; F、G、H 组分别为 30 mg/kg、50 mg/kg、100 mg/kg 剂量连续给药 5 d。

Fig. 1 Residue of norfloxacin 24 h after drug withdrawal in *Acipenser baerii*

Groups B, C, and D: orally administration of norfloxacin with the dosages of 30 mg/kg, 50 mg/kg and 100 mg/kg respectively for 3 d continuously; Groups F, G, and H: orally administration of norfloxacin with the dosages of 30 mg/kg, 50 mg/kg and 100 mg/kg respectively for 5 d continuously.

呈显著的线性关系, 各组织中表现的情况各不相同: 相同给药剂量、不同给药次数情况下(B/F 组、C/G 组和 D/H 组)血清中药物浓度无显著差异; 而肝、肾和软骨中均差异显著, 且 B 组与 F 组差异极显著。而相同给药次数、不同给药剂量情况下(B/C/D 组和 F/G/H 组)4 种组织均呈显著性差异。

由图 2 可见, 停药 240 h 后, 实验鱼 4 种组织中药物浓度显著下降, 组织中药物蓄积浓度依然表现为: 肾>软骨>肝>血清, 但同一给药剂量下不同给药次数相对应的组别(B 和 F、C 和 G、D 和 H)在停药 240 h 后, 实验鱼 4 种组织药物蓄积浓度差别较小, 无显著差异; 而不同剂量相同给药次数停药 240 h 后各组均呈显著差异。

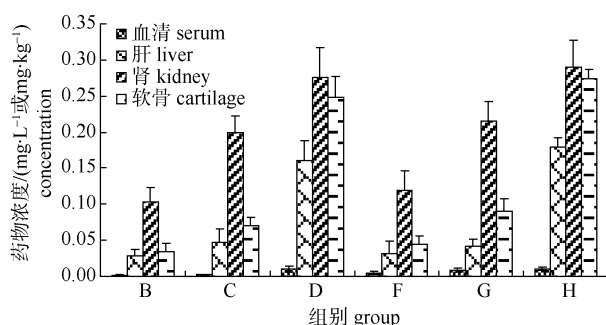


图 2 西伯利亚鲟口灌诺氟沙星停药 240 h 检测结果

B、C、D 组分别为 30 mg/kg、50 mg/kg、100 mg/kg 剂量连续给药 3 d; F、G、H 组分别为 30 mg/kg、50 mg/kg、100 mg/kg 剂量连续给药 5 d。

Fig. 2 Residue of norfloxacin 240 h after drug withdrawal in *Acipenser baerii*

Groups B, C, and D: orally administration of norfloxacin with the dosages of 30 mg/kg, 50 mg/kg and 100 mg/kg respectively for 3 d continuously; Groups F, G, and H: orally administration of norfloxacin with the dosages of 30 mg/kg, 50 mg/kg and 100 mg/kg respectively for 5 d continuously.

2.3 组织切片观察结果

2.3.1 肝 取各组实验鱼肝组织相同部位切片, 观察结果如图 3 所示。对照组(A 和 E 组)肝组织的切片(图 3-a)组织致密、结构清晰, 具有完整的肝索和肝血窦等结构, 肝细胞排列紧密, 核近圆形, 胞质饱满。停药 1 d 后的 B、C 和 F 组实验鱼肝组织切片观察结果与对照组相似, 未见明显变化。而停药 24 h 后的 G 组实验鱼肝组织(图 3-b)可见血细胞浸润现象, 且高倍镜下观察发现肝细

胞肿胀变形, 另有部分干细胞萎缩凋亡(图 3-d); 停药 24 h 后的 D 和 H 组实验鱼肝组织(图 3-c)可见肝血窦扩张, 大量血细胞浸润, 且高倍镜下(图 3-e)观察发现肝索结构基本消失, 肝细胞核固缩, 肝细胞肿胀变形甚至消溶; 停药 240 h 后的 D、G 和 H 组实验鱼肝组织均有逐渐恢复的趋势, H 组实验鱼肝组织切片(图 3-f)观察可见肝细胞增多, 肝索结构逐渐恢复, 但仍可见未消除彻底的萎缩肝细胞和血细胞。

2.3.2 肾 取各组实验鱼肾组织相同部位切片, 观察结果如图 4 所示。对照组(A 和 E 组)肾组织(图 4-a)结构完整, 肾小管清晰可见, 管壁细胞排列整齐紧密; 停药 24 h 后的 B、C 和 F 组实验鱼肾组织切片观察结果与对照组相似, 未见明显变化。而停药 24 h 后的 G 组实验鱼肾组织(图 4-b)切片观察可见肾小管结构不清晰, 管壁细胞排列稀疏、不整齐, 部分细胞肿胀变形、胞质分布不均; 停药 24 h 后的 D 和 H 组实验鱼肾组织(图 4-c)可见肾小管结构模糊不可辨, 管腔狭小, 肾小球萎缩变形, 高倍镜下(图 4-d)观察可见肾小管结构已不可见, 管腔内填充阻塞, 肾小管管壁细胞肿胀变形、部分细胞崩解。停药 240 h 后, D/G/H 组实验鱼肾组织切片未见明显恢复变化。

2.3.3 软骨 取各组实验鱼软骨组织相同部位切片, 观察结果如图 5 所示。对照组(A 和 E 组)切片(图 5-a)可见完整的脊髓、脊索鞘、软骨组织和软骨膜等结构, 软骨膜处(图 5-b)软骨细胞多扁平形且排列紧密, 内层软骨细胞则较大, 呈椭圆或镰刀形(估计为软骨细胞侧切观察结果), 高倍镜下(图 5-c)观察发现软骨细胞位于软骨隐窝内, 隐窝较大, 其中只包含一个软骨细胞, 软骨基质均匀、丰富; 停药 24 h 后的 B、C 和 F、G 组实验鱼肾组织切片观察结果与对照组相似, 未见明显变化。而 D 和 H 组实验鱼软骨组织变化情况较一致(图 5-d 和图 5-e), 停药 24 h 后可见软骨膜内层扁平细胞减少, 呈单层甚至稀疏不可见, 其他未见明显变化; 停药 240 h 后 D 和 H 组实验鱼软骨组织有恢复原状的变化, 软骨膜内层扁平细胞增多、细胞层增厚, 但仍有部分地方有空隙未长满, 待细胞恢复生长。

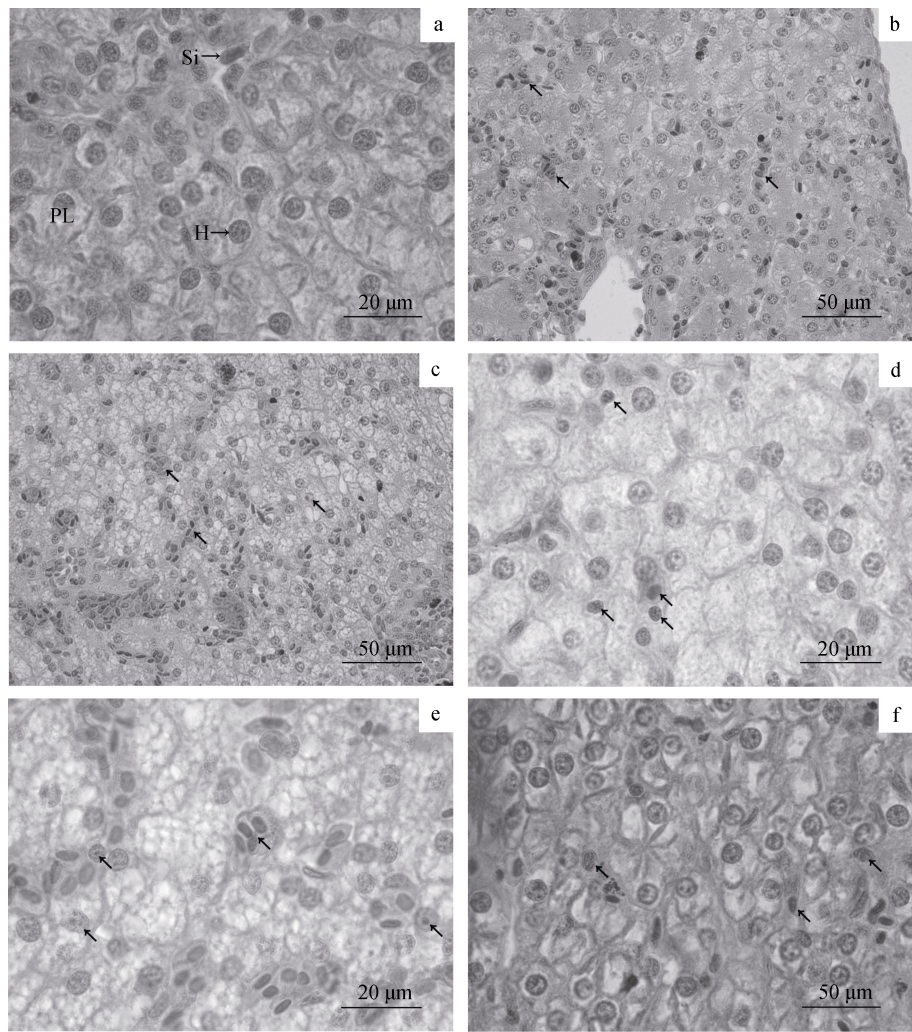


图 3 西伯利亚鲟肝组织切片观察结果

H: 肝细胞; PL: 肝细胞板; Si: 血窦.

a. 对照组; b. 停药 24 h 的 G 组; c.停药 24 h 的 D 和 H 组; d. 停药 24 h 的 G 组; e. 停药 24 h 的 D 和 H 组;
f. 停药 240 h 的 D 和 H 组. b-f 图中箭头示损伤部位.

Fig. 3 Histologic results of the liver tissues in *Acipenser baerii*

H: hepatocyte; PL: hepatocyte plate; Si: sinusoid.

a. Control group, normal liver tissue; b. The liver tissue of group G after drug withdrawal 24 h; c. The liver tissue of groups D and H after drug withdrawal 24 h; d. The liver tissue of group G after drug withdrawal 24 h; e. The liver tissue of groups D and H after drug withdrawal 24 h; f. The liver tissue of groups D and H after drug withdrawal 240 h. Arrows in b–f mean damaged tissues.

3 讨论

3.1 不同给药方案对 NFLX 在鲟体内各组织中蓄积浓度的影响

有报道指出对鲤口灌 NFLX 比肌注和混饲吸收好、生物利用度高^[23]。本研究采用组合不同给药剂量(30 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg)和不同给药次数(3 次和 5 次)的给药方案, 分别研究了不同

给药方案下, 口灌 NFLX 停药后 24 h 及 240 h 时实验鲟血清、肝、肾和软骨组织中的药物蓄积情况。实验结果表明, 随着给药剂量增大、给药次数增多, 实验鱼 4 种组织中药物蓄积浓度随之增高, 表现为肾>软骨>肝>血清, 与陈琛等^[10]报道的肌注 NFLX 后 24 h 时药物在金鲟体内肾>肝>血浆的组织分布蓄积情况一致。由于 NFLX 在消化道酸性环境中被溶解, 较完全的进入了肠道,

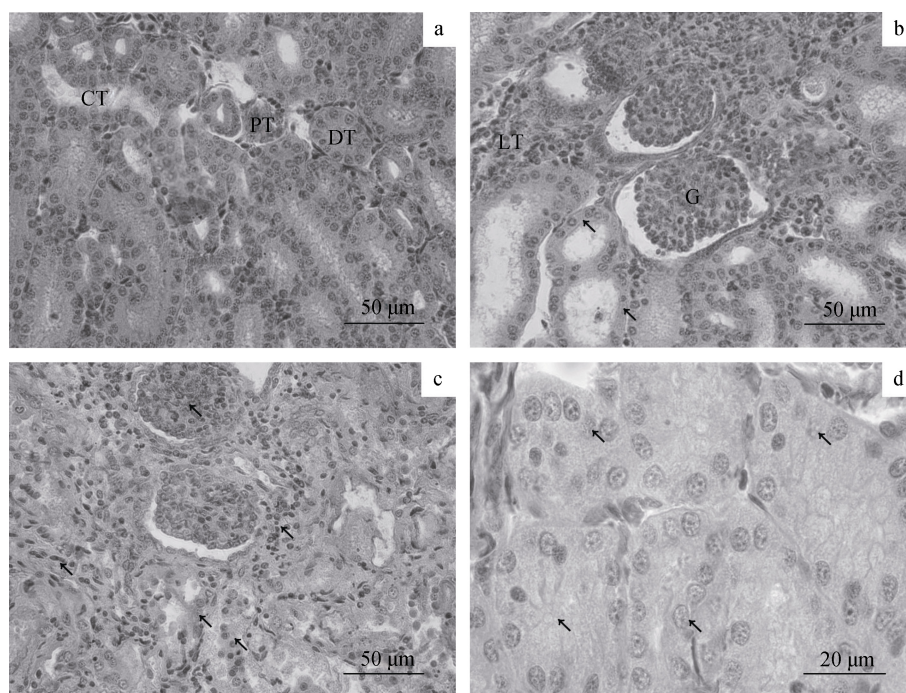


图 4 西伯利亚鲟肾组织切片观察结果

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

a. 对照组; b. 停药 24 h 的 G 组; c. 停药 24 h 的 D 和 H 组; d. 停药 240 h 的 D 和 H 组. b-d 图中箭头示组织损伤部位.

Fig. 4 Histologic results of the kidney tissues in *Acipenser baerii*

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

a. Control group; b. The kidney tissue of group G after drug withdrawal 24 h; c. The kidney tissue of groups D and H after drug withdrawal 24 h; d. The kidney tissue of groups D and H after drug withdrawal 240 h. Arrows in b-d mean damaged tissues.

主要以原型经肾排出, 且不易在肾小管中析出结晶^[24], 因而肾组织中药物蓄积浓度较高; 而软骨组织中药物大量蓄积可能是由于 NFLX 对软骨组织有较强的亲和力^[20]有关。

虽然不同给药方案间实验鲟 4 种组织中药物蓄积浓度差异显著, 但并不呈显著比例化剂量反应关系(dose proportionality, DP)^[25], 即进入体循环的药量变化与给药剂量不成正比关系。比较实验鲟 4 种组织中停药 24 h 后药物蓄积浓度的线性回归方程同样可以发现, 连续高浓度(50~100 mg/kg)多次给药(5 次)并不能造成药物在组织中的成倍、高效蓄积。这样的结果与王伟利等^[26]报道的 40 mg/kg 剂量以上药饵单次饲喂氟苯尼考, 罗非鱼血药浓度增幅降低, 药物利用率随给药剂量增加而降低的结果相一致。双因素回归分析表明, 给药剂量和给药次数对肝中药物蓄积浓度有显著影响, 其 P 值分别为 0.04144 和 0.04132 ($P < 0.05$);

而软骨组织中则有极显著影响, 其 P 值分别为 0.001192 和 0.002386 ($P < 0.01$)。肝既是水产动物的解毒器官又是排泄器官, 是水生生物体内鱼药残留的主要部分^[11, 27], 因而推测其组织药物蓄积浓度受机体获得药物的剂量和次数影响较大; 而 NFLX 对软骨组织有较强亲和力, 易在其中沉积, 而软骨组织中消化代谢药物的相关活性物质极少, 故而容易受到药物剂量和次数的直接影响。

停药 240 h 后, 实验鲟 4 种组织中药物蓄积浓度大幅下降, 但依然表现为: 肾>软骨>肝>血清。可与停药 24 h 后相比变化较大的是: 相同给药剂量不同给药次数情况下, 停药 24 h 时各组织中药物蓄积浓度差异显著, 而停药 240 h 后已无显著性差异, 推测药物浓度较高时代谢效率也相应的较高, 具体原因及代谢规律需进一步深入研究。

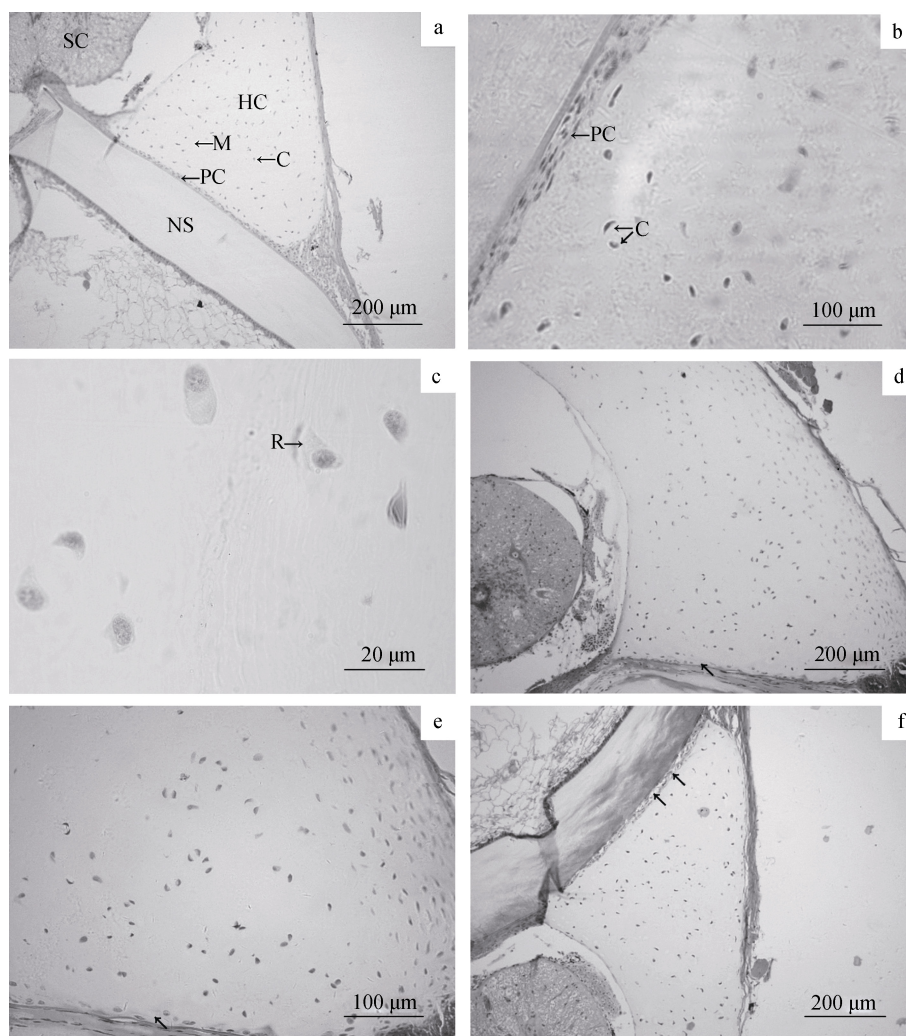


图 5 西伯利亚鲟软骨组织切片观察结果

NS: 脊索鞘; SC: 脊髓; HC: 软骨; PC: 软骨膜; C: 软骨细胞; M: 基质; R: 软骨陷窝。

a. 对照组; b. 对照组; c. 对照组; d. 停药 24 h 的 D 和 H 组; e. 停药 24 h 的 D 和 H 组; f. 停药 240 h 的 D 和 H 组。d-f 图中箭头示组织损伤部位。

Fig. 5 Histologic results of the cartilage tissues in *Acipenser baerii*

NS: notochord sheath; SC: spinal cord; HC: hyaline cartilage; PC: perichondrium; C: chondrocyte; M: matrix; R: cartilage capsule.

a. Control group; b. Control group; c. Control group; d. The cartilage tissue of groups D and H after drug withdrawal 24 h; e. The cartilage tissue of groups D and H after drug withdrawal 24 h; f. The cartilage tissue of groups D and H after drug withdrawal 240 h. Arrows in d-f mean damaged tissues.

3.2 西伯利亚鲟 3 种组织的药物损伤及恢复

随着给药剂量的增大、给药次数的增多,实验鲟肝、肾、软骨均出现了不同程度的损伤,停药 240 h 后,肝和软骨组织损伤有恢复趋势,但肾组织损伤后未见明显恢复。实验过程中 D 和 H 组实验鲟均有死亡现象出现,且在停止给药后 H 组依然有一定死亡率,故而推测死亡率可能主要是由于肾组织严重受损导致的。

含有丰富的药物代谢相关酶^[28]的肝组织,作

为药物代谢和转化的重要器官,也是比较容易受损害的脏器之一。高剂量多次 NFLX 口灌给药造成实验鲟肝组织负担过重,出现中毒现象和严重损伤,主要表现为肝组织出血,肝细胞变性、坏死,这样的结果与陈彦伶等^[17]报道的 NFLX 对中华鳖造成的药源性肝损伤结果一致。但与朱秋华等^[11]报道的 NFLX 在中华鳖(*Trionyx sinensis*)肾中残留最高但损伤较小不同,高剂量多次给药造成实验鲟肾组织严重受损,且停药 240 h 组织内药物浓度

急剧下降后, 依然未见显著恢复趋势。且高剂量给药组(D和H, 100 mg/kg)无论给药次数多少均造成了实验鲟肾组织严重损伤, 表明 NFLX 给药剂量比给药次数对鲟肾组织的损伤影响更显著。

西伯利亚鲟除头颅骨外绝大多数为软骨^[18], 而吴永魁等^[20]研究表明氟喹诺酮类药物(NFLX)对鲤软骨可造成难以恢复性损伤。另有报道指出, 喹诺酮类药物引起的关节软骨损害常发生在承受压力和运动的软骨上^[29], 可能是由于无血管的关节软骨由滑液提供营养, 滑液可能也是毒物到达组织的重要途径, 关节的运动有助于毒物扩散, 因而静止关节软骨损害较轻^[30]。经对西伯利亚鲟口灌 NFLX 研究表明: 高剂量 NFLX(100 mg/kg)剂量可对鲟软骨造成一定损伤, 主要表现为软骨膜处扁平细胞减少。而软骨膜内层扁平软骨细胞将逐步发育为幼稚软骨细胞至成熟软骨细胞, 因而其数量减少将影响软骨的发育和软骨细胞再生。而停药 240 h 后, 药物蓄积浓度下降, 软骨膜内层细胞有恢复生长的趋势, 表明药物造成的损伤有所减轻和恢复。

3.3 NFLX 在鲟养殖应用中的用药建议

采用不同给药方案对实验鲟口灌 NFLX 后, 研究表明, 30 mg/kg 剂量连续给药 3~5 次未对鲟造成组织损伤; 但 50 mg/kg 剂量连续给药 5 次, 将对鲟肝组织造成一定负担和损伤, 但停药一段时间后较好的恢复趋势; 而 100 mg/kg 剂量连续给药 3 次将对鲟肝、肾、软骨均造成剂量依赖的严重损伤, 且停药后肾无显著恢复趋势, 甚至造成大量死亡。因而, 在鲟养殖过程中 NFLX 的使用应严格避免高剂量多次给药, 以免对鱼体造成不可恢复性严重药物损伤。且应注意药物对软骨膜内层细胞发生、发育有一定影响, 应避免鱼体内长期药物蓄积残留, 以免妨碍软骨的正常发育引起发育迟缓, 甚至畸形。

且鲟软骨中药物蓄积浓度较高应引起药物动力学及残留规律研究方面的广泛关注。动物软骨因含有抗癌功能的硫酸软骨素等活性物质而具有重要生理学作用, 但家畜软骨产量较低^[31], 远远满足不了人们的需求; 而鲟头、脊索、鳍中软骨

占鱼体的10%左右, 是软骨制品的良好原料, 且相关养殖产业迅猛发展, 已逐渐成为软骨系列保健产品的主要来源^[32]。如何控制鲟软骨中药物蓄积浓度并掌握其确切代谢、残留信息是保证鲟软骨系列产业健康、绿色、长期发展的重要保障。

有报道指出, 适当的水流刺激可以诱导鱼类进行逆流运动, 促进鱼体代谢和加速药物残留的排除^[33]。且“肾主骨”是中医核心理论之一, 以补肾立法可促进骨与软骨的强张和生长^[34], 因而在鲟养殖中 NFLX 使用时选用适当的中药予以辅助应可减轻损伤、延缓退变、促进软骨分化和修复。

4 结论

作为一种高效、光谱抗菌药, NFLX 在水产动物养殖过程中有着极为广泛的应用。但因其对鲟肝、肾、软骨均有一定的潜在危害和损伤, 因而必须严格按照科学的给药方案使用。本实验中, 通过研究不同给药方案下口灌 NFLX 在鲟 4 种组织中蓄积浓度变化及组织损伤、恢复情况, 推荐 NFLX 对鲟安全使用剂量应小于 50 mg/kg, 连续给药次数应小于 5 次。且考虑鲟软骨市场蓬勃发展的现状及药物在软骨中高蓄积、低代谢, 又具有一定的阻碍软骨发育和再生的潜在危险, 建议应加强药物在软骨中代谢、残留及损伤修复方面的研究, 以确保 NFLX 在鲟养殖中的科学使用。

参考文献:

- [1] Meng Y, Wu G H, Zhu X H, et al. Simultaneous determination of norfloxacin, ciprofloxacin and enrofloxacin residues in liver of *Eriocheir sinensis* by RP-HPLC[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2005, 12(6): 772-778. [孟勇, 吴光红, 朱晓华, 等. RP-HPLC 同时测定中华绒螯蟹肝脏中诺如沙星、环丙沙星和恩诺沙星残留[J]. 中国水产科学, 2005, 12(6): 772-778.]
- [2] Zhao Y N, Li Y, Hu K, et al. The analysis of the controlled-release properties of norfloxacin microencapsulation [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2014, 38(4): 675-680. [赵依妮, 李怡, 胡鲲, 等. 诺氟沙星壳聚糖微胶囊缓释作用研究[J]. 水生生物学报, 2014, 38(4): 675-680.]
- [3] Guo H Y. Development of quinolonecarboxylic acid antibacterial agents in China[J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals, 1989, 20(9): 421-424. [郭惠元. 中国喹诺酮类抗菌

- 药物研究开发概况[J]. 中国医药工业杂志, 1989, 20(9): 421–424.]
- [4] Liu Y L, Wang X L, Yang X L, et al. Pharmacokinetics and residues of norfloxacin in *Pseudosciaena polyactis*[J]. Journal of Fisheries of China, 2007, 31(5): 655–660. [刘玉林, 王翔凌, 杨先乐, 等. 诺氟沙星在大黄鱼体内的药代动力学及残留研究[J]. 水产学报, 2007, 31(5): 655–660.]
- [5] Ezejiofor N A, Anusiem C A, Orish C N, et al. Acceleration of body clearance of isoniazid (Inh) by norfloxacin and ofloxacin[J]. J US-China Med Sci, 2011, 8(1): 19–23.
- [6] Brown S A, Cooper J, Gauze J J, et al. Pharmacokinetics of norfloxacin in dogs after single intravenous and single and multiple oral administrations of the drug[J]. Am J Vet Res, 1990, 51(7): 1065–1070.
- [7] Zhang Y B, Zhang Z X, Zheng W, et al. Application of Norfloxacin in treatment of bacterial diseases in fishes[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2000, 15(2): 79–85. [张雅斌, 张祚新, 郑伟, 等. 诺氟沙星在鱼类细菌性疾病中的应用研究[J]. 大连水产学院学报, 2000, 15(2): 79–85.]
- [8] Yan X F, Wang X M, Zhang L M. Drug prevention research of fulminant illness about megalobrama amblycephala, carp and crucian carp[C]//Proceedings on Fish Diseases. Beijing: China Ocean Press, 1995: 40–46. [严雪芬, 王杏明, 张黎明. 团头鲂、鲤、鲫等鱼类暴发性疾病的药物防治研究[C]//鱼病学研究论文集: 第二集. 北京: 海洋出版社, 1995: 40–46.]
- [9] Wang K Y. The development and application of quinolone antibacterial fish drugs[J]. Freshwater Fisheries, 1997, 27(2): 22–25. [汪开毓. 喹诺酮类抗菌鱼药的开发应用[J]. 淡水渔业, 1997, 27(2): 22–25.]
- [10] Chen C, Lu T Y, Wang D, et al. Pharmacokinetics of norfloxacin in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2011, 24(4): 25–28, 58. [陈琛, 卢彤岩, 王荻, 等. 诺氟沙星在金鳟体内的药物代谢动力学研究[J]. 水产学杂志, 2011, 24(4): 25–28, 58.]
- [11] Zhu Q H, Qian G Y. Residues of furazolidone, sulfadiazine and norfloxacin in soft turtle, *Trionyx sinensis*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2001, 8(3): 50–53. [朱秋华, 钱国英. 3 种药物在甲鱼体内的残留研究[J]. 中国水产科学, 2001, 8(3): 50–53.]
- [12] Zhang Z, Li J, Chen P, et al. Effects of norfloxacin on gill and serum ECOD, APND, and GST activity in *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(3): 514–520. [张喆, 李健, 陈萍, 等. 诺氟沙星对中国明对虾鳃和血清 ECOD、APND 和 GST 活性的影响[J]. 中国水产科学, 2012, 19(3): 514–520.]
- [13] Zhang J Q, Dong Y H. Adsorption and desorption of norfloxacin on four typical soils in China[J]. Environmental Science, 2007, 28(9): 2134–2140. [张劲强, 董元华. 诺氟沙星在 4 种土壤中的吸附-解吸特征[J]. 环境科学, 2007, 28(9): 2134–2140.]
- [14] Pang H L, Yang G M, Gao X C, et al. Impacts of pH and surfactants on adsorption behaviors of norfloxacin on marine sediments[J]. Environmental Science, 2012, 33(1): 129–134. [庞会玲, 杨桂明, 高先池, 等. pH 及表面活性剂对诺氟沙星在海洋沉积物上吸附行为的影响[J]. 环境科学, 2012, 33(1): 129–134.]
- [15] Liang X M, Lu J Y, Nie X P, et al. Toxicity of the food additive BHA (butylated hydroxyanisole) and antibiotic NFLX (norfloxacin) to swordtail fish (*Xiphophorus helleri*)[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2010, 30(1): 172–179. [梁惜梅, 鹿金雁, 聂湘平, 等. 饲料添加剂叔丁基对羟基茴香醚和抗生素诺氟沙星对剑尾鱼的毒性效应[J]. 环境科学学报, 2010, 30(1): 172–179.]
- [16] Fang Y C, Qi Y, Li Y, et al. Acute toxicity experience to guppy with ciprofloxacin HCL, enrofloxacin and norfloxacin [J]. Journal of Shenyang University: Natural Science, 2012, 24(3): 15–17. [房英春, 齐跃, 李莹, 等. 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[J]. 沈阳大学学报: 自然科学版, 2012, 24(3): 15–17.]
- [17] Chen Y L, Mou Q, Pan L D, et al. Establishment of drug-induced liver disease model and pathological observation in soft shell turtle *Trionyx sinensis*[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2013, 28(1): 61–66. [陈彦伶, 牟群, 潘连德, 等. 中华鳖药源性肝病模型的构建及其病理学观察[J]. 大连海洋大学学报, 2013, 28(1): 61–66.]
- [18] Song W, Song J K. Observations on morphology of post-embryonic development and histology of sensory organs in larval and juvenile Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(5): 790–798. [宋炜, 宋佳坤. 西伯利亚鲟仔稚鱼胚后发育的形态学和组织学观察[J]. 中国水产科学, 2012, 19(5): 790–798.]
- [19] Li S W, Wang D, Liu H B, et al. Molecular characterization of integrin-gene cassettes in multi-drug resistant *Aeromonas hydrophila* from fish[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(5): 1015–1022. [李绍戊, 王荻, 刘红柏, 等. 鱼源嗜水气单胞菌多重耐药菌株整合子的分子特征[J]. 中国水产科学, 2013, 20(5): 1015–1022.]
- [20] Wu Y K, Li Q X, Xia Z P, et al. Histopathological effect of norfloxacin on gill arch cartilages in common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2006, 21(4): 383–386. [吴永魁, 李乾学, 夏志平, 等. 诺氟沙星对鲤鳃弓软骨组织病理学的影响[J]. 大连水产学院学报,

- 2006, 21(4): 383–386.]
- [21] Viegas C S B, Simes D C, Williamson M K, et al. Sturgeon osteocalcin shares structural features with matrix gla protein: evolutionary relationship and functional implications[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(39): 27801–27811.
- [22] Li J H, Yang X L, Lu C P, et al. Newly compiled fishery drugs manuals[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2005: 205. [李健华, 杨先乐, 陆承平, 等. 新编渔药手册[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 205.]
- [23] Zhang Y B, Zhang Z X, Zheng W, et al. Study on pharmacokinetics of Norfloxacin in carp following different forms administration[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2000, 24(6): 559–563. [张雅斌, 张祚新, 郑伟, 等. 不同给药方式下鲤对诺氟沙星的药代动力学研究[J]. 水产学报, 2000, 24(6): 559–563.]
- [24] Li R. Pharmacology[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1999: 291–297. [李瑞. 药理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 291–297.]
- [25] Yin Y, Chen C. Optimizing first-time-in-human trial design for studying dose proportionality[J]. *Drug Inf J*, 2001, 35(4): 1065–1078.
- [26] Wang W L, Luo L, Jiang L, et al. Blood concentration and histological toxicology of different dosages of florfenicol in GIFT Nile tilapia[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2014, 23(1): 90–94. [王伟利, 罗理, 姜兰, 等. 不同剂量氟苯尼考对罗非鱼血药浓度的影响及组织毒理学研究[J]. 上海海洋大学学报, 2014, 23(1): 90–94.]
- [27] Sun M, Li J, Zhang Z, et al. Residues and elimination of norfloxacin in tissues from *fenneropenaeus chinensis* following different forms administration[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2011, 41(5): 43–48. [孙铭, 李健, 张喆, 等. 诺氟沙星 2 种不同给药方式在中国对虾体内的残留及消除规律[J]. 中国海洋大学学报, 2011, 41(5): 43–48.]
- [28] Han H, Li J, Li J T, et al. Effects of quinolones on activity of hepatic drug-metabolizing enzymes in *Paralichthys olivaceus* [J]. *Marine Sciences*, 2009, 33(11): 48–54. [韩华, 李健, 李吉涛, 等. 喹诺酮类药物对牙鲆肝药物代谢酶活性的影响[J]. 海洋科学, 2009, 33(11): 48–54.]
- [29] Qu F. Cartilage toxicity of the quinolones[J]. *Chinese Journal of Clinical Pharmacy*, 1998, 19(1): 61–64. [曲芬. 喹诺酮类药物的软骨毒性[J]. 中国临床药理学杂志, 1998, 19(1): 61–64.]
- [30] Wilsman N J, Van Sickle D C. The relationship of cartilage canals to the initial osteogenesis of secondary centers of ossification[J]. *Anatomical Record*, 1970, 168(3): 381–391.
- [31] Wang K, Ye J D, Liu Y. Determination and evaluation of nutrients in sturgeon cartilage[J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2006, 28(2): 187–188. [王琨, 叶继丹, 刘永. 鲟鱼软骨主要营养成分分析及评价[J]. 营养学报, 2006, 28(2): 187–188.]
- [32] Xu Y A, Chen S P, Su J H, et al. Extraction of chondroitin sulfate from Amur sturgeon and its antitumor activity[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2010, 19(4): 553–559. [许永安, 陈守平, 苏金华, 等. 史氏鲟鱼硫酸软骨素的提取及抗肿瘤活性的研究[J]. 上海海洋大学学报, 2010, 19(4): 553–559.]
- [33] Song B L, Lin X T, Xu Z N. Effects of upstream locomotion training on metabolism and norfloxacin hydrochloride residues of juvenile tinfoil barbs *Barbodes schwanenfeldii*[J]. *Freshwater Fisheries*, 2012, 42(6): 3–7. [宋波澜, 林小涛, 许忠能. 逆流运动对多鳞四须鲃幼鱼活动代谢及体内盐酸诺氟沙星残留的影响[J]. 淡水渔业, 2012, 42(6): 3–7.]
- [34] Guo J, Zhang Q D. Advance in the research on the mechanism of tonifying kidney herbs that protect the articular cartilage[J]. *Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine*, 2010, 28(12): 2515–2518. [郭婕, 张前德. 补肾中药对关节软骨的保护作用机制研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(12): 2515–2518.]

Norfloxacin accumulation rule and toxicity to Siberian sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt)

WANG Di¹, LI Shaowu¹, FENG Juan^{2,3}, LU Tongyan¹

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

2. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;

3. Key Laboratory for Exploitation & Utilization of Marine Fisheries Resources in South China Sea, Ministry of Agriculture, Guangzhou 510300, China

Abstract: Norfloxacin is an efficacious broad-spectrum antibiotic that has been used widely to prevent and control fish bacterial diseases. However, no comprehensive study has examined the toxicity of norfloxacin to aquatic animals. Siberian sturgeon is the principle sturgeon species cultured in China and has high scientific research and production value. Quinolones occasionally cause an abnormal spinal column in Siberian sturgeon when used to control bacterial diseases. Thus, we investigated the accumulation rule and toxicity of different norfloxacin dosages and exposure times in Siberian sturgeon. Norfloxacin was given orally to experimental fish at dosages of 0, 30 mg/kg, 50 mg/kg, and 100 mg/kg for 3–5 d. Blood, liver, kidney, and cartilage were collected for 24–240 h. The quantities of drug retained in the four tissues were determined, and histological sections of the liver, kidney, and cartilage were observed. The results showed that the concentrations of norfloxacin in the four Siberian sturgeon tissues increased gradually with increasing norfloxacin dosage and time in a trend of kidney > cartilage > liver > serum. Significant differences in liver, kidney, and cartilage drug concentrations were detected when norfloxacin was given to fish at the same dosage but for different durations. These differences disappeared after withdrawal for 240 h. The histology indicated that the liver and kidney were damaged when norfloxacin was given to fish at 50 mg/kg for 5 d, and the damage appeared to be more serious at 100 mg/kg for 3–5 d. Damage to the liver, but not the kidney, recovered gradually during the 240 h withdrawal. The number of chondrocytes near the perichondrium decreased in cartilage when norfloxacin was given at 100 mg/kg for 3–5 d but recovered gradually during the 240 h withdrawal. These results suggest that the norfloxacin dosage should be no more than 50 mg/kg and that exposure time should be < 5 d to prevent liver, kidney, and cartilage damage. Based on these results, norfloxacin exhibited potential damage to the liver, kidney, and cartilage in Siberian sturgeon, suggesting that the dosing regimen must be strictly followed in sturgeon aquaculture. Further study is needed to describe norfloxacin metabolism, residue, and damage repair. Suitable Chinese herbal medicines could be used to promote cartilage differentiation and repair.

Key words: norfloxacin; Siberian sturgeon; accumulation rule; toxicity

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