

文章编号: 1674 - 5566(2014)01 - 0090 - 05

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

王伟利¹, 罗理¹, 姜兰¹, 常藕琴¹, 鞠晶^{1,2}, 肖贺^{1,2}, 谭爱萍¹,
邓玉婷¹, 赵飞¹

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所 农业部渔药创制重点实验室, 广东 广州 510380; 2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 为研究氟苯尼考在罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 体内的吸收特征及组织毒理, 在 30 ℃ 实验条件下, 分别按 0、5、12、20、40、80、100 mg/kg 的给药剂量, 通过药饵单次饲喂实验罗非鱼氟苯尼考后, 使用 HPLC 方法检测各剂量组的血药浓度, 结果发现各剂量组 10 h 的血药浓度分别为 0、1.49 ± 0.46、2.66 ± 0.62、5.08 ± 0.75、10.60 ± 2.34、13.74 ± 2.87、14.42 ± 0.49 μg/mL (M ± SD, n ≥ 6, n 为各浓度点数据量), 表明随着给药剂量的增加, 实验动物体内血药浓度也随之上升, 但 40 mg/kg 剂量以上, 其浓度增幅降低, 提示药物利用率随着给药剂量的增加而降低。在相同试验条件下, 按照 0、12、20、40、100 mg/kg 的给药剂量连续饲喂罗非鱼 7 d 以研究药物对罗非鱼的组织毒理特性, 组织切片显示 20 mg/kg 以下剂量组未见明显病变, 在高剂量组 (40 mg/kg、100 mg/kg) 则出现了剂量依赖的肝肾细胞损伤现象, 并且该损伤在继续饲养 7 d 的情况下未见修复。建议生产上的给药剂量不高于 20 mg/kg, 以免造成机体组织损伤, 利用率降低及环境污染等问题。

研究亮点: 在水产药物药动学研究及用药指导方面, 目前多通过单一剂量的药动学研究结合体外抑菌实验, 推荐渔用药物的给药剂量, 对于不同剂量药物在水生动物体内的利用率及其相关的毒性研究较少。本文对不同剂量氟苯尼考对罗非鱼血药浓度及组织毒理开展了研究和报道, 为科学使用氟苯尼考防治罗非鱼细菌性病害提供了科学依据。

关键词: 氟苯尼考; 罗非鱼; 不同剂量; 组织毒理

中图分类号: S 948

文献标志码: A

氟苯尼考 (florfenicol, FF) 又称氟甲砜霉素, 是氯霉素类广谱抗菌药物, 于 1999 年被批准投入使用于防治细菌性疾病, 由于其结构不含氯霉素中抑制骨髓造血机能的硝基苯环, 大大降低了对动物和人体的毒性, 在安全性和有效性方面比氯霉素和甲砜霉素具有明显的优势, 在国内外畜牧和水产动物养殖上迅速获得广泛应用^[1-2]。氟苯尼考作为动物专用的抗菌药物, 具有良好的抗菌效果, 对于水生动物气单胞菌属细菌及近年来多发的链球菌病均有一定防治效果^[3-4]。氟苯尼考在鱼体上的临床使用推荐剂量为 7 ~ 15 mg/kg^[5], 实际生产中, 养殖生产者常不按规定用药, 而以推荐剂量的 2 倍、3 倍甚至更高剂量使用, 造

成大量原型药物及代谢物排泄入环境。抗菌药物的不规范使用, 不仅会对动物机体造成直接毒害, 而且会经动物排泄物或其它途径进入环境, 对人体及环境生态造成严重影响^[6]。

目前国内外对氟苯尼考的残留检测文献报道较多, 但对该药用于水产动物的毒性研究鲜见报道, 肝肾作为动物体内药物处置的主要器官, 其功能损害将直接影响药物在体内的动力学过程。同时增大给药剂量后血药浓度变化的趋势仍未见文献描述。为了解氟苯尼考的合理给药剂量及安全性, 本研究以我国水产养殖出口规模最大的罗非鱼为研究对象, 分析不同剂量氟苯尼考在鱼体内的血药浓度变化及其对罗非鱼的组

收稿日期: 2013-04-08 修回日期: 2013-10-08

基金项目: 公益性行业 (农业) 科研专项 (201203085); 广东省科技计划项目 (2011B020307001)

作者简介: 王伟利 (1978—), 男, 助理研究员, 研究方向为水产药物。E-mail: yihui-w@163.com

通信作者: 姜兰, E-mail: jianglan2@tom.com

织毒理学,探讨科学的给药剂量问题,以提高疗效,减少浪费与污染,降低毒副作用。

1 材料与方 法

1.1 实验鱼、药品及试剂

健康吉富罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 购自珠江水产研究所水产养殖基地,平均体重 (150 ± 10) g。暂养于实验池内,颗粒料饲养驯化,抽样检测表明体内无氟苯尼考残留。给药前 5 天,转入实验鱼缸,每缸 1 尾喂养,给药前 24 h 停饲。实验期间自然光照,供氧充足,实验水温 30 ℃。

氟苯尼考标准品购自中国兽医药品监察所(含量 99.5%,批号 K0300801),氟苯尼考可溶性粉(10%)由珠江水产研究所水产药物实验厂提供,乙腈为色谱纯,Fisher 公司产品;乙酸乙酯,正己烷,甲醛、冰醋酸、苦味酸、二甲苯等均为分析纯。

Bouin's 液: $V(15\% \text{ 苦味酸饱和溶液}) : V(40\% \text{ 甲醛}) : V(\text{冰醋酸}) = 75 : 25 : 5$ 配制而成。

1.2 仪器及色谱条件

仪器: Waters 2695 色谱仪, 2475 荧光检测器, IKA T18 均质器, Organomation 旋转蒸发仪, SIGMA 3K15 离心机, 泰维 TC-120 型智能程控生物组织自动脱水机, 泰维 TK-218 型恒温摊片烤片机, 泰维 TB-718D2 型生物组织自动包埋机, LEICA RM2135 切片机, 日本 OLYMPUS CX21-BIM 生物显微镜等。

色谱条件: 流动相 $V(\text{乙腈}) : V(\text{水}) = 35 : 65$, 流速 1.0 mL/min; 色谱柱 waters Atlantis dC18 色谱柱 (150 nm \times 4.6 mm, 5 μm); 柱温 30 ℃; Ex 228 nm, Em 280 nm; 进样量 20 μL 。

1.3 给药、取样及样品处理方法

1.3.1 不同给药剂量对血药浓度的影响

分别按照 5、12、20、40、80 和 100 mg/kg 的给药剂量配制药饵单次饲喂实验罗非鱼, 每组 6 尾鱼。对照组饲以空白饲料。

分别在给药后 10 h 尾静脉采血, 肝素钠抗凝, 3 000 r/min 离心 5 min, 取 1 mL 上层血浆, 添加 5 mL 乙酸乙酯, 震荡 3 min, 7 000 r/min 离心 5 min, 取上层乙酸乙酯于另一 10 mL 离心管中; 45 ℃ 氮气吹干, 1 mL 流动相溶解, 1 mL 乙腈饱和正己烷除脂, 0.45 μm 滤膜过滤后, 使用 HPLC 荧光检测方法测定药物浓度, 检测结果使用 Excel 软

件计算标准偏差及绘制散点图。

1.3.2 不同给药剂量的组织毒理学研究

设定 0、12、20、40、100 mg/kg 5 个给药剂量组, 每组 6 尾鱼, 连续药饵给药饲喂 7 d 后, 每个剂量组常规取样 3 尾试验鱼肝脏和肾脏, 用 Bouin's 液固定, 经脱水、石蜡包埋、切片、染色等过程处理后, 于显微镜下观察其病理学变化。其余试验鱼继续使用空白饲料饲喂 7 d 后, 再次取样进行切片观察。

2 结果

2.1 不同给药剂量下氟苯尼考在罗非鱼的血药浓度

图 1 中, 随着给药剂量的增加, 血药浓度也逐渐上升, 但增幅逐渐减缓。图的中间段 (12 ~ 40 mg/kg) 峰形最为陡峭, 表明给药剂量在该阶段内的变化, 会显著地影响实验鱼体内的血药浓度; 40 mg/kg 后, 峰形逐渐平缓, 表明随着给药剂量的增加, 相同时间药物血药浓度也增加, 但血药浓度增幅减少。随着给药剂量的增加, 血药浓度并不按比例呈线性增加, 间接说明给药剂量越大, 药物被鱼体的吸收利用率就越低, 直接排泄出去的原型药物也就越多。

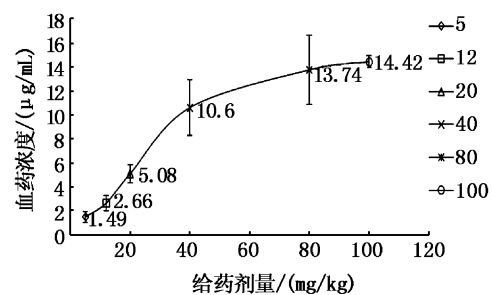


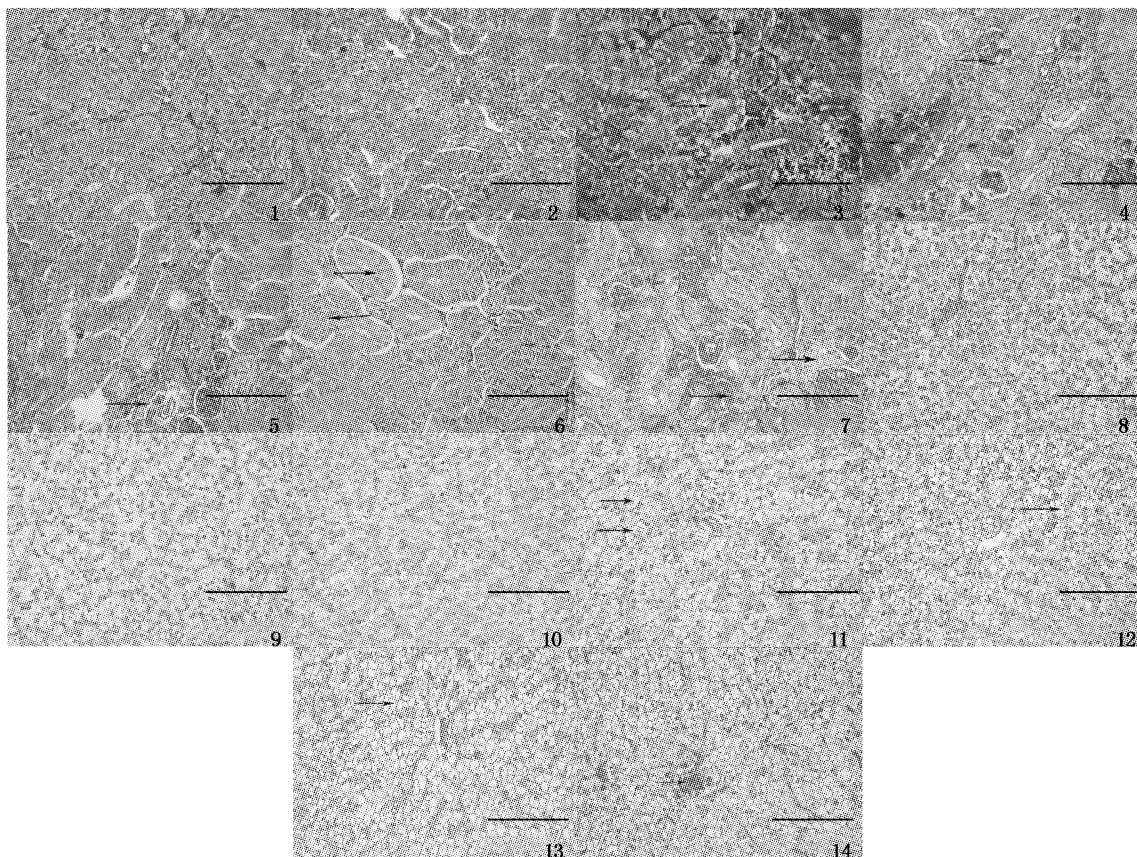
图 1 不同剂量氟苯尼考给药 10 h 后的血药浓度
Fig. 1 Blood concentration of different dosage florfenicol at 10 h after feed administration in GIFT

2.2 组织毒理学研究

实验过程中, 各剂量组实验鱼均未发现明显的临床变化。各剂量组连喂 7 d 后, 取试验鱼肝脏和肾脏样品切片检测, 与空白对照相比较, 12 mg/kg 剂量组均未见明显变化, 肾脏组织 20 mg/kg 剂量组开始出现病变, 见轻微的肾管肿胀和颗粒变性 (图版 - 3); 随着剂量的增加, 病变也越发明显, 40、100 mg/kg 剂量组见肾小管上皮细胞水肿, 体积增大, 肾小球附近肾小管上皮颗粒变性,

肾组织出血(图版-4,6),肾小球肿胀,轻微出血(图版-4),部分肾小管上皮细胞脱落(图版-5),有颗粒变性和肾管萎缩的迹象(图版-6),出现肾间质细胞增生(图版-7)等。肝脏组织发现了类似的规律,在40 mg/kg 剂量组开始发现病变,见细胞变性,局灶性细胞坏死(图版-11、12、

13),肝血窦淤血等(图版-14)等。而且用药7 d后再用空白料饲喂7 d的组织病变较用药7 d组未见改善,表明停止用药后,体内依然在较长一段时间内残存过高浓度的药物,持续对机体组织造成损伤。



图版 不同剂量氟苯尼考下罗非鱼的肝肾组织切片

Plate Tissue sections of liver and kidney of *Tilapia* after fed different doses of florfenicol

1. 肾脏对照; 2. 7 d, 12 mg/kg; 3. 7 d, 20 mg/kg, 轻微肾管肿胀和颗粒变性; 4. 7 d, 40 mg/kg, 肾组织出血, 肾小球肿胀、出血; 5. 7 + 7 d, 40 mg/kg, 肾小管上皮细胞脱落; 6. 7 d, 100 mg/kg, 肾组织出血, 肾管萎缩, 颗粒变性; 7. 7 + 7 d, 100 mg/kg, 肾间质细胞增生; 8. 肝脏对照; 9. 7 d, 12 mg/kg; 10. 7 d, 20 mg/kg; 11. 7 d, 40 mg/kg, 颗粒变性, 局灶性细胞坏死; 12. 7 + 7 d, 40 mg/kg, 颗粒变性和空泡变性; 13. 7 d, 100 mg/kg, 空泡变性; 14. 7 + 7 d, 100 mg/kg, 肝血窦内淤血; Bar = 100 μm 。

3 讨论

3.1 给药剂量与利用率

氟苯尼考作为新一代氯霉素类抗菌药物,具有优良的抗菌效力。近年来国内外多位学者均进行了氟苯尼考对水产常见病原菌的抑菌性试验,结果发现最小抑菌浓度 MIC 多在 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下,少数病原菌达到 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [7-9]。氟苯尼考在鱼体内吸收迅速,王伟利等[10]按 12 mg/kg 的剂量饲喂罗非鱼,2 h 后即可达到 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度,

维持时间大于 24 h。本研究按不同剂量给药,发现在 5 ~ 40 mg/kg 剂量范围内,血药浓度会随着给药剂量的增加显著升高,超过 40 mg/kg 后,血药浓度增幅显著减缓。说明适当提高给药剂量能够增加动物体内血药浓度,减少达到有效杀菌浓度的时间,提高临床治疗效果;但过量给药不能无限提高罗非鱼对药物的吸收,反而会导致药物利用率降低,环境污染等[11-13]问题。

3.2 剂量与毒性

动物实验及抗菌实验表明氟苯尼考具有高

效低毒的特点。INGLIS 等以 100 mg/kg 的氟苯尼考投喂大西洋鲑稚鱼 10 d,未发现任何组织器官病变^[14];GAIKOWSKI 等^[15]每天使用 0、10、30、50 mg/kg 剂量的氟苯尼考连续饲喂斑点叉尾鲟 20 d,各剂量组均未发现死亡和临床变化,但 30 和 50 mg/kg 剂量组出现摄食量下降,组织切片观察发现,斑点叉尾鲟的前肾、后肾和脾脏从 10 mg/kg 的剂量开始即发现有剂量依赖性的造血组织和淋巴细胞增殖组织减少,其严重的程度与剂量呈显著相关。ALI 等^[16]使用 20 mg/kg 的剂量通过肌注和静脉注射途径在骆驼、绵羊和山羊上连用 7 d,均未发现不良反应,通过血浆酶活性及代谢产物比较,提示肝肾功能均属正常范围;徐力文等^[17]使用氟苯尼考对杂色鲍进行急性毒性试验,发现其对稚鲍的 96 h 急性毒性的 LC_{50} 为 (162.67 ± 17.41) mg/L,组织切片观察发现:鲍消化腺和肾脏损伤严重,消化腺腺管上皮细胞界限模糊,肾小管上皮细胞的刷状缘及肾腔和集合管的纤毛脱落等,其它器官未见明显病变。本研究使用氟苯尼考连续饲喂试验罗非鱼 7 d,各个剂量组均未发现死亡及明显的临床症状,但肝、肾组织切片观察发现,20 mg/kg 以下剂量组未出现明显的组织病变,而 40 mg/kg 以上剂量组均出现了肾小球肿胀出血,肾小管上皮细胞颗粒变性,肾管萎缩及间质细胞增生等;以及肝脏细胞变性,局灶性细胞坏死等组织病理学变化。显示,虽然氟苯尼考对不少动物的安全范围较广,但不同动物对于氟苯尼考的耐受性存在差异。水生动物因种类繁多,生理特性差异巨大,对药物的敏感性不一,更应规范使用,过量使用药物会对肝、肾组织器官造成损伤,进而对药物在体内的代谢过程和机体的抵抗力造成影响。

参考文献:

- [1] CANNON M, HARFORD S, DAVIES J. A comparative study on the inhibitory actions of chlormphenicol, thiamphenicol and some fluorinated derivatives [J]. *Antimicrob Chemotherob Chemotherapy*, 1990, 26: 307 - 317.
- [2] FUKUI H, FUJIHARA Y, KANO T. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of florfenicol, a new fluorinated analog of thiamphenicol, against fish pathogens [J]. *Fish Pathology*, 1987, 22(4): 201 - 220.
- [3] 曹海鹏, 闫明, 杨先乐. 氟苯尼考的体外抑菌作用及其对鲫抗嗜水气单胞菌感染的效果[J]. *渔业现代化*, 2007, 34(4): 47 - 53.
- [4] 刘永涛, 艾晓辉, 杨红. 水产致病菌对氟甲砜霉素敏感性及其耐药性研究[J]. *水利渔业*, 2008, 28(4): 124 - 127.
- [5] 杨先乐. 新编渔药手册[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 189.
- [6] KUMAR K, GUPTA S C, BAIDOO S K, et al. Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure[J]. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 2005, 34(6): 2082 - 2085.
- [7] 廖昌容, 徐力文, 陈毕生. 氟苯尼考对六种海洋致病弧菌的体外抗菌活性研究[J]. *水产养殖*, 2005, 26(4): 1 - 4.
- [8] MCGINNIS A, GAUNT P, SANTUCCI T, et al. *In vitro* evaluation of the susceptibility of *Edwardsiella ictaluri*, etiological agent of enteric septicemia in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), to florfenicol [J]. *Vet Diagn Invest*, 2003, 15(6): 576 - 579.
- [9] MICHEL C, KEROUAULT B, MARTIN C. Chlormphenicol and florfenicol susceptibility of fish-pathogenic bacteria isolated in France: comparison of minimum inhibitory concentration, using recommended provisory standards for fish bacteria[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, 95(5): 1008 - 1015.
- [10] 王伟利, 罗理, 姜兰, 等. 适温条件下氟苯尼考在罗非鱼体内的药物动力学[J]. *大连海洋大学学报*, 2010, 25(4): 285 - 288.
- [11] RANG H P, DALE M M. *Pharmacology*, seconded[M]. London: Churchill Livingstone, 1991.
- [12] SARMAH A, MICHAEL K, MEYER T, et al. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment[J]. *Chemosphere*, 2006, 65(5): 725 - 759.
- [13] XU W H, ZHANG G, ZOU S C, et al. Determination of selected antibiotics in the Vitoria Harbour and the Pearl River, South China using high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. *Environmental Pollution*, 2007, 145(3): 672 - 679.
- [14] INGLIS V, RICHARDS R H, VARMA K J, et al. Florfenicol in *Atlantic salmon*, *Salmonsalar L*, parr: tolerance and assessment of efficacy against furunculosis [J]. *Journal of Fish Diseases*, 1991, 14: 343 - 351.
- [15] GAIKOWSKI M P, WOLF J C, ENDRIS R G, et al. Safety of Aquaflor (florfenicol, 50% type A medicated article), administered in feed to channel catfish, *Ictalurus punctatus* [J]. *Toxicologic Pathology*, 2003, 31(6): 689 - 697.
- [16] ALI B H, AL-QARAWI A A, HASHAAD M. Comparative plasma pharmacokinetics and tolerance of florfenicol following intramuscular and intravenous administration to camels, sheep and goats[J]. *Veterinary Research Communications*, 2003, 27: 475 - 483.
- [17] 徐力文, 廖昌容, 刘广峰, 等. 氟苯尼考对杂色鲍的急性毒性及组织毒理学[J]. *大连水产学院学报*, 2005, 20(4): 295 - 299.

Blood concentration and histological toxicology of different dosages of florfenicol in GIFT Nile tilapia

WANG Wei-li¹, LUO Li¹, JIANG Lan¹, CHANG Ou-qin¹, JU Jing^{1,2}, XIAO He^{1,2}, TAN Ai-ping¹, DENG Yu-ting¹, ZHAO Fei¹

(1. Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, Guangdong, China; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Florfenicol (FFC), a synthetic broad-spectrum antibiotic, with a structural analogue of thiamphenicol is active against many thiamphenicol-resistant strains. Due to its broad antibacterial spectrum and with no side effects of aplastic anemia, FFC has been widely used in livestock, poultry, and is also legally permissive to be used in aquaculture. To study the absorption characteristics of florfenicol in GIFT Nile tilapia, which was the biggest quantity export farming fish, the 10 hour blood samples were detected using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection method after feed administration of 0, 5, 12, 20, 40, 80, 100 mg/kg of florfenicol at 30 °C. Results showed: the concentration was (Mean ± Standard Deviation, n ≥ 6) 0, 1.49 ± 0.46, 2.66 ± 0.62, 5.08 ± 0.75, 10.60 ± 2.34, 13.74 ± 2.87 and 14.42 ± 0.49 µg/mL respectively. The concentration increased with the increase of dosage at the same time in blood, while the increase amplitude decreased, which indicated the decreased utilization of drug to the increasing dosage. In the same experiment condition, 0 (control), 12, 20, 40, 100 mg/kg body weight of florfenicol a day were given to GIFT in feed for 7 consecutive days to study the histological toxicology of florfenicol. There were no mortalities or clinically observable changes found at any of the dose levels tested. Dose dependent ultrastructural damages were found in cells of kidney and liver at the dosages of 40 and 100 mg/kg, the damage could not be repaired after 7 days at the end of the test, while no obvious pathological changes were found at dosages under 20 mg/kg. We recommend the dosage of no more than 20 mg/kg, otherwise it may damage the function of liver and kidney, lower utilization and cause environmental pollution, etc.

Key words: florfenicol; GIFT Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*); different dosage; histological toxicology