

腹腔注射恩诺沙星和氟苯尼考对红笛鲷血清 IgM 含量的影响

张丽敏, 吴灶和, 简纪常, 鲁义善, 彭志东, 简贺君

(广东海洋大学, 广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室, 广东 湛江 524025)

摘要: 以 $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 恩诺沙星和氟苯尼考分别腹腔注射红笛鲷, 通过间接酶联免疫吸附实验法 (ELISA) 测定红笛鲷血清 IgM 的含量, 研究恩诺沙星与氟苯尼考对红笛鲷血清 IgM 含量的影响。结果显示: 健康红笛鲷血清中 IgM 抗体的含量为 $3.591\pm 0.314 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 注射后, 恩诺沙星组增加至 $4.234\pm 0.013 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 第 3 周后恢复至初始水平, 而氟苯尼考组则降低至 $2.538\pm 0.214 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 第 5 周仍未恢复至初始水平。可见, 恩诺沙星可提高红笛鲷血清中抗体 IgM 的含量, 而氟苯尼考则降低鱼体血清中抗体 IgM 的含量, 且影响时间也较长。

关键词: 红笛鲷; 血清抗体; IgM; 恩诺沙星; 氟苯尼考; ELISA 法

中图分类号: S942.5

文献标志码: A

文章编号: 1673-9159 (2009) 03-0033-05

Effects of Intraperitoneally Injected Enrofloxacin and Florfenicol on Serum IgM Concentration in Crimson Snapper (*Lutjanus sanguineus*)

ZHANG Li-min, WU Zao-he, JIAN Ji-chang, LU Yi-shan, PENG Zhi-dong, JIAN He-jun
(Guangdong Key Laboratory of Pathogenic Biology and Epidemiology for Aquatic Economic Animals,
Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

Abstract: After injection with $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Enrofloxacin and Florfenicol intraperitoneally, the IgM concentration of Crimson Snapper (*Lutjanus sanguineus*) were investigated by using indirect ELISA. Results showed that :the concentration of serum antibody IgM of Crimson Snapper is $3.591\pm 0.314 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Enrofloxacin group can enhance the fish antibody IgM to $4.234\pm 0.013 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. It returned to initial level three weeks later, while the Florfenicom group's was reduced to $2.538\pm 0.214 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, and did not returned to initial level in the fifth week. This shows that Enrofloxacin can increase serum levels of IgM antibody but Florfenicol decrease them and have longer time effects.

Key words: *Lutjanus sanguineus*; serum antibody; IgM; Enrofloxacin; Florfenicol

红笛鲷(*Lutjanus sanguineus*)又名红鱼, 是我国南方沿海的重要经济鱼类之一。但近年来频繁发生的鱼病已严重制约了其养殖业的发展, 因而了解该物种的免疫能力十分必要。鱼体血清中抗体含量的高低可较直观地反映机体的免疫能力和抗病能力。硬骨鱼类的免疫系统欠发达, 抗体类型较少, 常见有 IgM。红笛鲷血清中也含有这种高分子抗体

IgM, 但其血清维度尚不清楚。为了解红笛鲷的免疫力, 研究其血清中 IgM 含量非常必要。目前, 水产动物血清中 IgM 含量测定常利用琼脂扩散实验, 由于该法误差大, 重复性及敏感性差^[1], 阻碍了红笛鲷体液免疫的进一步深入研究。本研究建立了间接酶联免疫吸附实验(间接 ELISA 法), 并测定了健康红笛鲷血清中抗体 IgM 含量。由于传统的抗菌药

收稿日期: 2009-01-08

第一作者: 张丽敏 (1977-), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向为鱼类免疫学。lmzhang2005@yahoo.com.cn

通讯作者: 简纪常, 男, 教授, 博士。电话: 0759-2339319, E-mail: jianjichang@21cn.com

物治疗方法在水产养殖动物疾病防治中仍占有重要地位,故本研究同时设立两组抗菌药物实验组,分析抗菌药物给药后鱼体血清中抗体水平的变化,以了解红笛鲷血清中抗体 IgM 的含量及抗菌药物对红笛鲷免疫力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要药品及试剂 恩诺沙星、氟苯尼考:浙江海翔医药化工有限公司,粉剂,质量分数 $\geq 98\%$;人标准 IgM:购自卫生部上海生物制品研究所;羊抗人 IgM:北京麒麟宏伟生物工程公司生产;兔抗红笛鲷 IgM 抗血清:本实验室提供;酶标第二抗体:驴抗羊 HRP-IgG、羊抗兔 IgG-HRP,华美生物工程公司生产;邻苯二胺:SIGMA FASTTM OPD Tablet Set, Sigma 公司生产;伊利高蛋白脱脂奶粉:内蒙古伊利实业集团股份有限公司产品。

1.1.2 实验鱼 红笛鲷,180尾,健康无病,体重 250 ± 50 g,饲养于湛江南油的6个海水网箱($3\text{ m}\times 2\text{ m}$),30尾/箱,每天按鱼体重8%投喂冰鲜杂鱼,水温(25 ± 5) $^{\circ}\text{C}$,海水相对密度1.005~1.018,实验前驯养一周,实验前一天不投喂。

1.2 实验方法

1.2.1 恩诺沙星、氟苯尼考腹腔注射实验 以 $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的恩诺沙星腹腔注射红笛鲷,每周注射1次,共注射5次。每个网箱为一个实验组,每组实验设立一个平行组和对照组。对照组注射等量无菌生理盐水。氟苯尼考组的实验方法同恩诺沙星组。

1.2.2 血清中抗体 IgM 含量的测定 连续注射5周后,每周从每个网箱取5尾红笛鲷尾静脉抽血,血液于室温下放置4~5h后,以 $12\,000\text{ r}/\text{min}$ 离心10min,取血清,于 -80°C 下保存备用。每周取材1次,共取材5周。参照朱立平等^[1]方法,采用间接 ELISA 法测定血清中 IgM 的含量。

1.2.3 人 IgM 标准曲线制作

1.2.3.1 棋盘滴定法确定羊抗人 IgM 与驴抗羊 HRP-IgG 的最适工作浓度 以包被液按1:1 600、1:3 200、1:6 400、1:12 800、1:25 600比例稀释的羊抗人 IgM,包被96孔酶标板,100 μL /孔,于 37°C 下温育2h;甩干后用磷酸盐-吐温缓冲液(PBST, pH 7.4)洗3次,每次5min,每孔加50 mg/mL 脱脂奶封闭,于 37°C 下孵育1h;用 PBST 洗3次,将驴抗羊 HRP-IgG 用 PBST 作 1:500、1:

1 000、1:2 000、1:4 000 稀释,以100 μL /孔加入各孔,于 37°C 下孵育1h;用 PBST 洗5次,加100 μL 邻苯二胺(OPD)显色液,于 37°C 下避光显色20min;最后快速加入50 μL 2 mol/L H_2SO_4 终止反应,于酶标仪上读取 $\text{OD}_{492\text{ nm}}$ 的值。同时设对照组,平行测定。以阳性 $\text{OD}_{492\text{ nm}}$ 约为1、阴性 $\text{OD}_{492\text{ nm}}$ 较小、稀释倍数最大的稀释度为最适稀释倍数。

1.2.3.2 人 IgM 标准曲线测定 以包被液系列对半稀释初始浓度为 $9.375\,0\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的人标准 IgM(按产品说明书溶解标准血清),包被96孔酶标板,于 37°C 下温育2h;甩干后用洗涤液(PBST, pH 7.4)洗板3次,每次5min,每孔加满50 mg/mL 脱脂奶,于 37°C 下温育,用 PBST 封闭1h;洗涤后每孔加100 μL 稀释的羊抗人 IgM,设对照组平行测定,于 37°C 下温育1h;洗涤后每孔加100 μL 稀释的驴抗羊 IgG-HRP,于 37°C 下温育1h;PBST 洗板5次,每次5min,然后每孔加100 μL OPD 显色液,于 37°C 下避光显色20min;最后快速加入50 μL 2 mol/L H_2SO_4 终止反应,于酶标仪上读取 $\text{OD}_{492\text{ nm}}$ 值。

以人标准浓度 IgM 为横坐标, $\text{OD}_{492\text{ nm}}$ 值为纵坐标,应用 SPSS13.0 回归分析制作标准曲线。

1.2.4 间接 ELISA 方法测定血清抗体 IgM 含量

1.2.4.1 棋盘滴定法确定兔抗红笛鲷 IgM 与山羊抗兔 HRP-IgG 的最适工作浓度 方法同 1.2.3.1。

1.2.4.2 包被血清的最佳工作浓度 参照文献[1],将红笛鲷血清稀释200倍包被 ELISA 板。每孔100 μL ,共12个血样,每个血样做6个平行孔。

1.2.4.3 包被最佳反应时间 于湿盒中置于 37°C 烘箱中温育2h,其他条件相同,优化反应条件。

1.2.4.4 ELISA 程序 以每孔100 μL 包被液稀释(200倍)的红笛鲷血清包被96孔酶标板,放置湿盒中温育2h;然后甩干后用洗涤液(PBST, pH 7.4)洗板3次,每次5min,每孔加满5%脱脂奶封闭,于 37°C 温育1h;洗涤后每孔加100 μL 稀释32 000倍的兔抗红笛鲷 IgM 血清,设对照组和空白组进行平行测定,于 37°C 下温育1h;洗涤后每孔加100 μL 羊抗兔 IgG-HRP,于 37°C 下温育1h;PBST 洗板5次,每次5min,然后每孔加100 μL OPD 显色液,置 37°C 下避光显色20min;最后快速加入50 μL 2 mol/L H_2SO_4 终止反应,于酶标仪上读取 $\text{OD}_{492\text{ nm}}$ 值。

1.3 数据统计分析

采用 SPSS13.0 分析软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA)和 Duncan 多重比较。组间显著差异用不同字母表示($P<0.05$)。

2 结果

2.1 ELISA 法最佳工作结合浓度的确定

由表 1 可见,当 OD_{492nm} 值为 1.015 和 0.985 时,羊抗人 IgM 血清为 1:1 600,驴抗羊 IgG-HRP 稀释

度 1:2 000 时,其数值符合实验的要求,作为本实验的最佳工作浓度。

由表 2 可见,取 OD_{492nm} 值最接近于 1.0 时,兔抗红笛鲷 IgM 和山羊抗兔 IgG-HRP 稀释度为 1:32 000 和 1:2 000。

表1 羊抗人IgM血清与驴抗羊IgG-HRP的最佳工作浓度

Tab. 1 Optimal working concentration of goat anti-human IgM serum and donkey anti- goat IgG-HRP

驴抗羊IgG-HRP稀释度	羊抗人IgM血清稀释度					空白对照
	1:1 600	1:3 200	1:6 400	1:12 800	1:25 600	
1:500	2.793	2.755	2.857	2.807	2.680	0.057
1:500	2.751	2.725	2.875	2.808	2.696	0.061
1:1 000	1.753	1.673	0.580	1.556	1.468	0.062
1:1 000	1.758	1.651	1.653	1.478	1.467	0.067
1:2 000	1.015	0.957	0.926	0.911	0.860	0.058
1:2 000	0.985	0.962	0.937	0.894	0.906	0.062
1:4 000	0.526	0.523	0.540	0.465	0.479	0.069
1:4 000	0.518	0.507	0.555	0.480	0.473	0.058

表2 兔抗红笛鲷IgM与羊抗兔IgG-HRP的最佳工作浓度

Tab.2 Optimal working concentration of rabbit anti- crimson snapper IgM and goat anti- rabbit IgG-HRP

羊抗兔IgG-HRP稀释度	兔抗红笛鲷IgM稀释度					空白对照
	1:4 000	1:8 000	1:16 000	1:32 000	1:64 000	
1:1 000	2.494	2.439	2.312	2.172	1.268	0.058
1:1 000	2.485	2.461	2.302	2.012	1.228	0.057
1:2 000	1.593	1.404	1.241	1.021	0.619	0.059
1:2 000	1.601	1.380	1.179	1.093	0.626	0.057
1:4 000	0.844	0.732	0.631	0.528	0.318	0.063
1:4 000	0.849	0.739	0.627	0.537	0.335	0.058
1:8 000	0.453	0.430	0.340	0.311	0.196	0.055
1:8 000	0.462	0.428	0.348	0.325	0.193	0.062

2.2 人 IgM 标准曲线的制作

5 个梯度的标准人 IgM 浓度与相对应 OD_{492nm} 见表 3, 用 SPASS13.0 分析得回归方程为 $Y = 0.014 \times X + 0.6315$, R^2 为 0.931, 线性拟合良好。

2.3 红笛鲷血清 IgM 含量的测定

红笛鲷血清 IgM 含量见表 4。注射后, 恩诺沙星注射组第 1、2 周后红笛鲷血清 IgM 含量有显著性升高, 但在第 3 周后快速恢复至初始水平。氟苯尼考注射组中, IgM 含量显著降低, 且受影响时间较长, 直到第 5 周仍未恢复至初始水平。可见即使同是抗菌药物, 但不同类的抗菌药物对红笛鲷生物体内抗体 IgM 含量的影响却相反。

表3 不同浓度标准人 IgM OD_{492nm} 值

Tab.3 OD_{492nm} values of different concentrations of human standard IgM

组别	标准人 IgM 质量浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)				
	9.375 0	4.687 5	2.343 8	1.171 9	0.585 9
1	0.776	0.705	0.702	0.661	0.622
2	0.745	0.711	0.668	0.642	0.629
3	0.765	0.711	0.674	0.634	0.630
4	0.731	0.72	0.664	0.638	0.626
5	0.778	0.747	0.643	0.644	0.625
6	0.728	0.691	0.705	0.642	0.618
平均	0.753	0.714	0.676	0.644	0.625

表4 红笛鲷血清中抗体 IgM 的质量浓度
Tab.4 IgM content in serum of Crimson snapper (*Lutjanus sanguineus*)

组别	第1周	第2周	第3周	第4周	第5周
对照组	3.603±0.253 ^a	3.584±0.315 ^a	3.597±0.377 ^a	3.571±0.478 ^a	3.601±0.273 ^a
恩诺沙星组	4.221±0.609 ^b	4.247±0.374 ^b	3.761±0.424 ^a	3.728±0.281 ^a	3.693±0.196 ^a
氟苯尼考组	2.221±0.306 ^c	2.484±0.275 ^c	2.533±0.113 ^b	2.793±0.248 ^b	2.657±0.447 ^b

说明: 同一列内小写字母不同, 表示同一取样时间不同组间值有显著性差异 ($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 健康红笛鲷血清中抗体 IgM 的含量

血清中抗体的含量可较直接反映机体的免疫能力或抵抗疾病能力。在体液免疫过程中, 当鱼体受到外界抗原刺激时, 会大量合成分泌抗体 IgM, 且通过 IgM 来抵御外源异物的入侵。本研究采用棋盘滴定法确定了羊抗人 IgM 血清、驴抗羊 IgG-HRP 最佳工作浓度为 1:1 600、1:2 000, 兔抗红笛鲷 IgM 和山羊抗兔 IgG-HRP 为 1:32 000 和 1:2 000。采用间接 ELISA 法, 测定了红笛鲷血清中总抗体含量为 $3.591 \pm 0.314 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。这一方法与单向免疫扩散法比较耗时较短, 且灵敏度较高, 测得血清中抗体 IgM 的含量低于虹鳟 ($7.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)^[2]、鲤鱼 ($4.8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)^[3] 和大西洋鲑 ($5.62 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)^[4], 但高于牛 ($3.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)、猪 ($3.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和鸡 ($1.85 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)^[5]。这些结果之间的差异可能与动物个体、生长阶段及研究者所使用的实验方法不同有关。

3.2 恩诺沙星对红笛鲷血清中抗体 IgM 含量的影响

恩诺沙星 (Enrofloxacin, EF) 又名乙基环丙沙星, 为第 3 代氟喹诺酮类抗菌药。本实验发现, 恩诺沙星对红笛鲷血清抗体 IgM 的影响较大。注射恩诺沙星后第 1 周、第 2 周, 可显著提高血清中抗体 IgM 的含量, 但影响时间较短, 在取样后期, 恩诺沙星对红笛鲷血清中 IgM 的影响已经消失。这可能是注射前期, 恩诺沙星在鱼体内的代谢物环丙沙星可直接刺激鱼体 IgM 的产生。这一研究结果与 Roszkowski 等^[6]及 Jimenez-Valera 等^[7]的结果相似, 他们发现环丙沙星以剂量依赖的方式显著提高 B61/c 小鼠 IgM 的产生; 而小鼠用致敏红细胞免疫后给予环丙沙星 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, IgM 连续 3 d 增加。本研究表明, 恩诺沙星在抗菌抑菌的同时对红笛鲷血清中抗体 IgM 的含量有一定促进作用, 但其具体作用机理尚需进一步研究。

3.3 氟苯尼考对红笛鲷血清中抗体 IgM 含量的影响

氟苯尼考 [D(+)-苏-1-对甲砒基苯基-2-二氯乙酰氨基-5 氟丙醇] 为甲砒霉素的单氟衍生物, 是一

种化学合成的氯霉素类动物专用的新型广谱抗菌药。本实验表明, 氟苯尼考抑制红笛鲷血清中抗体 IgM 的合成与分泌, 而且抑制时间较长。停药后 5 周还处在抑制状态, 这除了与氟苯尼考本身的药物特性及用量有关外, 还可能与氟苯尼考在红笛鲷体内的药物残留时间较长有关。氟苯尼考是氯霉素的最新同系物及替代品, 早在 20 世纪 60 年代初期就发现超过一定浓度的氯霉素可直接抑制淋巴细胞再次抗体形成反应^[8], 所以血液中高残留的氟苯尼考对抗体 IgM 也可能直接起抑制作用。Lunden 等^[9]研究了氟苯尼考对虹鳟免疫调节的影响, 结果表明, 试验鱼通过腹腔注射接种油剂二联苗 (抗疝病和弧菌病), 并于免疫后第 1、3、6 天经胃管按 $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 投喂虹鳟, ELISA 法检测抗体发现, 氟苯尼考对该二联苗抗体产生水平无显著影响。本研究与 Lunden 等结果有异, 这可能与氟苯尼考用药方法和用药次数有关。因此, 在实际生产中, 建议在腹腔注射给药时, 氟苯尼考剂量不宜超过 $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 并应控制好给药次数。

抗菌药物的免疫调节作用虽已有研究, 但目前仍处起步阶段, 许多问题尚不清楚或有待深入研究, 需从事感染、免疫效应器有关的工作者共同研究, 才能在抗菌治疗的同时充分发挥该类药物的免疫增强作用, 并尽最大可能降低免疫抑制作用的影响, 为实际生产服务。

参考文献

- [1] 朱立平, 陈学清. 免疫学常用实验方法[M]. 北京: 人民军医出版社, 2000: 352-356.
- [2] Kobayashi K, Hara A, Takano K, et al. Studies on subunit components of immunoglobulin M from a bony fish, the chum salmon (*Oncorhynchus keta*) [J]. Molecular immunology, 1982, 19(1): 95-103.
- [3] Vilain C, Wetzel M C. Structural and functional analysis of spontaneous

波吉卵囊藻对抗生素的敏感性及其无菌化培养

李静红, 黄翔鹤, 刘慧玲

(广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524025)

摘要: 研究了青霉素、链霉素、庆大霉素和卡那霉素对波吉卵囊藻生长的影响, 采用 4 种方法添加抗生素获得无菌藻株, 比较波吉卵囊藻除菌前后的生长特点。结果表明: 青霉素和链霉素浓度为 1 000 IU/mL 时, 对波吉卵囊藻生长无明显影响; 庆大霉素和卡那霉素浓度达 500 IU/mL 时, 对波吉卵囊藻生长无明显影响。微藻培养液中细菌对抗生素敏感性实验表明, 除青霉素外, 链霉素、庆大霉素和卡那霉素均对藻液中细菌有明显抑制作用。采用 4 种方法添加抗生素, 均可获得无菌藻株。与未除菌时相比, 无菌的波吉卵囊藻不易老化。

关键词: 波吉卵囊藻; 抗生素; 敏感性; 无菌化培养

中图分类号: X173

文献标志码: A

文章编号: 1673-9159 (2009) 03-0037-05

Sensitivity to Antibiotics and Axenic Culture of *Oocystis borgei*

LI Jing-hong, HUANG Xiang-hu, LIU Hui-ling

(Fisheries College of Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

Abstract: Effects of 4 kinds of antibiotics (penicillin, streptomycin, kanamycin, gentamycin) on the growth of *Oocystis borgei* were studied. The axenic *Oocystis borgei* was obtained by four ways of adding antibiotics, and the characteristics of growth between nonaxenic and axenic *Oocystis borgei* were compared as well. The results showed: the growth of *Oocystis borgei* was not significantly affected by penicillin and streptomycin at the concentration of 1 000 IU/mL, and there were no significant effect on the growth of this alga when the concentration of kanamycin and gentamycin were 500 IU/mL. Except penicillin, there were bacteriostasis effects of the other 3 kinds of antibiotics. Antibiotics were added to the culture medium by 4 processes, and the axenic culture could all be obtained. Compared with axenic

收稿日期: 2008-09-22

基金项目: 广东省科技计划项目 (2006A20305003); 广东省自然科学基金 (8152408801000003)

第一作者: 李静红 (1984—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向为渔业环境及其调控。

通讯作者: 黄翔鹤 (1962—), 男, 教授, 从事水生生态学研究。E-mail:hxh166@126.com.

- antitritrophenyl antibodies in the cyprinid fish species: carp (*Cyprinus carpio*), gold fish (*Carassius auratus*) and tench (*Tinca tinca*) [J]. Developmental and comparative immunology, 1984, 8(3): 611-622.
- [4] Leslie G A, Ctem L W, Phylogeny of immunoglobulin structure and function:III[J]. Journal of immunology, 1969, 130(6): 1337-1352.
- [5] 杨廷彬, 尹学盘. 实用免疫学[M]. 长春: 长春出版社, 1994.
- [6] Roszkowski W, Ko H L, Roszkowskik, et al. Effects of floxacin ont the humoral and cellular immune responses in Balb/c-mice[J]. Zentralb bacterial Mikrobiob Hyg, 1986, 262(3): 396.
- [7] Jimenez-Valera M, Sampedro A, Moreno E, et al. Modification of immune response in mice by ciprofloxacin[J]. Antimicrobial agents and chemotherapy, 1995, 39(1): 150.
- [8] Banck G, Forsgren A. Antibiotics and suppression of lymphocyte function in vitro[J]. Antimicrobial agents and chemotherapy, 1979, 16(5): 554-560.
- [9] Lunden T, Miettinen S. Effect of florfenicol on the immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Veterinary immunology and immunopathology, 1999, 67(4): 317-325.