

学校编码: 10384  
学号: 33120141151691

密级\_\_\_\_\_

廈門大學

硕士学位论文

乳酸诺氟沙星对横纹东方鲀和斜带石斑鱼  
免疫系统的影响

Effects of Norfloxacin Lactate on the Immune System of  
*Takifugu oblongus* and *Epinephelus coioides*

何倩婷

指导教师姓名: 陈荣 副教授  
专业名称: 环境科学  
论文提交日期: 2017 年 5 月  
论文答辩时间: 2017 年 5 月

2017 年 5 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( 陈荣 )课题(组)的研究成果,获得( 陈荣 )课题(组)经费或实验室的资助,在( 陈荣 )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名): 何倩婷

2017年5月29日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：何倩婷

2017年5月29日

## 目 录

摘 要 .....	I
Abstract .....	III
第一章 绪论.....	1
1.1 抗生素的污染现状.....	1
1.1.1 抗生素的使用与迁移.....	1
1.1.2 抗生素的残留.....	4
1.2 抗生素的危害.....	7
1.2.1 抗生素抗性危机.....	7
1.2.2 抗生素的毒性.....	8
1.3 鱼类免疫系统的研究现状.....	11
1.3.1 鱼类免疫系统概述.....	11
1.3.2 抗生素对鱼类免疫系统的影响.....	15
1.3.3 其他药物对鱼类免疫系统的影响.....	16
1.4 本研究的内容、目的和意义.....	17
1.4.1 研究背景.....	17
1.4.2 研究内容.....	18
1.4.3 研究目的和意义.....	18
1.5 本研究的技术路线.....	18
第二章 乳酸诺氟沙星对横纹东方鲀免疫系统的影响.....	20
2.1 引言.....	20
2.2 实验材料.....	20
2.2.1 实验动物.....	20
2.2.2 实验试剂.....	21
2.2.3 实验仪器.....	22
2.3 实验方法.....	22
2.3.1 污染实验.....	22
2.3.2 样品收集.....	23

2.3.3 脏器指数测定.....	23
2.3.4 血细胞计数.....	23
2.3.5 血清溶菌酶活力测定.....	23
2.3.6 酶联免疫指标测定.....	24
2.3.7 数据统计与分析.....	24
2.4 结果与讨论.....	25
2.4.1 乳酸诺氟沙星对横纹东方鲀脏器指数的影响.....	25
2.4.2 乳酸诺氟沙星对横纹东方鲀 RBCs 的影响.....	26
2.4.3 乳酸诺氟沙星对横纹东方鲀血清溶菌酶活力的影响.....	28
2.4.4 乳酸诺氟沙星对横纹东方鲀 IFN- $\gamma$ 的影响.....	29
2.4.5 乳酸诺氟沙星对横纹东方鲀免疫球蛋白 IgM 的影响.....	31
2.5 本章小结.....	33
<b>第三章 乳酸诺氟沙星对斜带石斑鱼免疫系统的影响.....</b>	<b>35</b>
3.1 引言.....	35
3.2 实验材料.....	35
3.2.1 实验动物.....	35
3.2.2 实验试剂.....	35
3.2.3 实验仪器.....	36
3.3 实验方法.....	36
3.3.1 实验设计.....	36
3.3.2 样品收集.....	37
3.3.3 血细胞计数.....	37
3.3.4 血清溶菌酶活力测定.....	37
3.3.5 酶联免疫指标测定.....	37
3.3.6 qPCR 实验方法.....	39
3.3.7 数据统计与分析.....	43
3.4 结果与讨论.....	43
3.4.1 乳酸诺氟沙星对斜带石斑鱼血红细胞数量的影响.....	43
3.4.2 乳酸诺氟沙星对斜带石斑鱼血清溶菌酶活力的影响.....	45

3.4.3 乳酸诺氟沙星对斜带石斑鱼 IFN- $\gamma$ 的影响 .....	46
3.4.4 乳酸诺氟沙星对斜带石斑鱼白细胞介素 IL-8 的影响 .....	47
3.4.5 乳酸诺氟沙星对斜带石斑鱼补体 C3 的影响 .....	49
3.4.6 乳酸诺氟沙星对斜带石斑鱼免疫球蛋白 IgM 的影响 .....	51
3.5 本章小结 .....	53
<b>第四章 总结与展望 .....</b>	<b>55</b>
4.1 结论 .....	55
4.2 创新点 .....	55
4.3 展望 .....	56
参考文献 .....	57
攻读硕士期间发表的论文 .....	69
致谢 .....	70

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## Contents

Abstract (in Chinese).....	I
Abstract (in English) .....	III
Chapter 1 Introduction .....	1
1.1 The contamination of antibiotics .....	1
1.1.1 The use and migration of antibiotics.....	1
1.1.2 The redidues of antibiotics.....	4
1.2 The hazard of antibiotics.....	7
1.2.1 Antibiotic resistance crisis .....	7
1.2.2 The toxicity of antibiotics .....	8
1.3 Current research on the immune system of fish.....	11
1.3.1 Overview of the immune system of fish.....	11
1.3.2 Effects of antibiotics on the immune system of fish.....	15
1.3.3 Effects of othre drugs on the immune system of fish .....	16
1.4 The contents, purpose and significance of this study .....	17
1.4.1 Research background.....	17
1.4.2 Research contents.....	18
1.4.3 The significance of the research.....	18
1.5 The technical route of this study .....	18
Chapter 2 Effects of Norfloxacin Lactate on the immune system of <i>Takifugu obscurus</i> .....	20
2.1 Introduction.....	20
2.2 Meterials .....	20
2.2.1 Experimental animals.....	20
2.2.2 Experimental reagent .....	21
2.2.3Experimental apparatus.....	22
2.3 Methods.....	22

2.3.1 Pollution experiment.....	22
2.3.2 Sample collection.....	23
2.3.3 Determination of organ index .....	23
2.3.4 Red blood cells count.....	23
2.3.5 Determination of serum lysozyme activity .....	23
2.3.6 Determination of enzyme-linked immunosorbent index .....	24
2.3.7 Statistical analysis.....	24
2.4 Results and discussion .....	25
2.4.1 Effect of Norfloxacin Lactate on organ index of <i>T. obscurus</i> .....	25
2.4.2 Effect of Norfloxacin Lactate on RBCs of <i>T. obscurus</i> .....	26
2.4.3 Effect of Norfloxacin Lactate on serum lysozyme activity of <i>T. obscurus</i> .....	28
2.4.4 Effect of Norfloxacin Lactate on IFN- $\gamma$ of <i>T. obscurus</i> .....	29
2.4.5 Effect of Norfloxacin Lactate on IgM of <i>T. obscurus</i> .....	31
2.5 Summary.....	33
Chapter 3 Effects of Norfloxacin Lactate on the immune system of <i>Epinephelus coioides</i> .....	35
3.1 Introduction.....	35
3.2 Materials .....	35
3.2.1 Experimental animals.....	35
3.2.2 Experimental reagent .....	35
3.2.3 Experimental apparatus.....	36
3.3 Methods.....	36
3.3.1 Experimental design.....	36
3.3.2 Sample collection.....	37
3.3.3 Red blood cells count.....	37
3.3.4 Determination of serum lysozyme activity .....	37
3.3.5 Determination of enzyme-linked immunosorbent index .....	37
3.3.6 qPCR methods .....	39



3.3.7 Statistical analysis .....	43
3.4 Results and discussion .....	43
3.4.1 Effects of Norfloxacin Lactate on RBCs of <i>E. colioides</i> . .....	43
3.4.2 Effect of Norfloxacin Lactate on serum lysozyme activity of <i>E. colioides</i> . .....	45
3.4.3 Effect of Norfloxacin Lactate on IFN- $\gamma$ of <i>E. colioides</i> . .....	46
3.4.4 Effect of Norfloxacin Lactate on IL-8 of <i>E. colioides</i> . .....	47
3.4.5 Effect of Norfloxacin Lactate on C3 of <i>E. colioides</i> . .....	49
3.4.6 Effect of Norfloxacin Lactate on IgM of <i>E. colioides</i> . .....	51
3.5 Summary .....	54
Chapter 4 Summary and prospects .....	55
4.1 Conclusions.....	55
4.2 Innovation points .....	55
4.3 Prospects .....	56
Reference.....	57
Articles published during the Master's project .....	69
Acknowledgement.....	70

## 摘要

抗生素在全世界范围内使用广泛,大量应用于人类医疗、畜牧业和水产养殖业等方面。抗生素的滥用和处置不当导致其在环境中的残留量居高不下。水产养殖业中频繁使用抗生素,不仅加剧了抗生素污染,更对水产品健康构成了威胁。目前大量研究集中于抗生素的药物毒性和抗生素抗性危机,关于抗生素尤其是喹诺酮类抗生素对鱼类免疫系统的影响研究鲜有报道。

本研究以乳酸诺氟沙星(Norfloxacin Lactate, NOR)为研究对象,初次实验以横纹东方鲀(*Takifugu oblongus*)为受试动物,采用药浴方式将其暴露于 0 mg/L、0.5 mg/L、5 mg/L 和 50 mg/L NOR 中,第 1、4、7、10 d 后,采集横纹东方鲀血液、头肾和肝脏样品,测定血红细胞(Red Blood Cells, RBCs)数量、血清溶菌酶(Lysozyme, LZM)活力、头肾和肝脏干扰素  $\gamma$ (Interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )和免疫球蛋白 M(Immunoglobulin M, IgM)含量;进一步以斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)为受试动物,研究了斜带石斑鱼暴露于 0 mg/L、0.05 mg/L、0.5 mg/L 和 5 mg/L NOR 28 d 期间免疫系统的变化,前 21 d 为污染暴露实验,而后转入清洁海水进行 7 d 恢复实验,分别收集第 1、4、7、14、21、28 d 各组的斜带石斑鱼血液和头肾样品,测定血液 RBCs 数量和血清 LZM 活力、头肾 IFN- $\gamma$ 、补体(Complement 3, C3)、白细胞介素(Interleukin-8, IL-8)和 IgM 表达量、头肾 C3 和 IgM 基因相对表达量,结果如下:

(1) NOR 暴露会对横纹东方鲀和斜带石斑鱼非特异性免疫系统产生影响:两种鱼类的 RBCs 都显著降低,且暴露浓度越高损伤作用越明显;对两种鱼类的血清 LZM 在暴露前 10 d 都存在刺激作用,暴露 14 d 后斜带石斑鱼的血清 LZM 活力显著下降,并且 NOR 浓度越高对血清 LZM 溶菌酶活力的抑制和刺激作用越明显;NOR 对两种鱼类的 IFN- $\gamma$  和斜带石斑鱼的 C3、IL-8 都存在一定的刺激作用,0.5 mg/L 和 5 mg/L 组的刺激作用最明显,0.05 mg/L 组的刺激作用在暴露前期显现,而 5 mg/L 组的刺激作用在暴露中后期显现,但未存在明显的剂量-效应关系。

(2) NOR 暴露会刺激横纹东方鲀和斜带石斑鱼特异性免疫反应: NOR 在整个暴露期间对横纹东方鲀和斜带石斑鱼的头肾 IgM 表达量整体都呈现出刺激作

用,且 0.5 mg/L 组的刺激作用出现在暴露 1-4 d 内,5 mg/L 组的刺激作用出现在暴露 7 d 后,但未出现明显剂量效应。

(3) NOR 暴露期间,斜带石斑鱼头肾免疫相关基因 C3 和 IgM 相对表达量发生紊乱,C3 基因表达量在暴露期间出现上调,而 IgM 基因在暴露期间被反复地抑制和诱导,说明 NOR 对 IgM 基因的毒性作用更大。

(4) 恢复实验结果表明 NOR 对斜带石斑鱼产生持续的免疫毒性效应:对 RBCs 和血清 LZM 活力产生的抑制作用 7 d 内不可恢复;0.05 mg/L 组非特异性免疫指标(IFN- $\gamma$ 、C3、IL-8)及特异性免疫指标 IgM 反而出现显著下调;各浓度组 C3 与 IgM 基因表达量也被显著抑制。

关键词: 抗生素; 乳酸诺氟沙星; 横纹东方鲀; 斜带石斑鱼; 免疫毒性

## Abstract

The abuse of antibiotics and the improper treatment of them contribute to their high residual quantity in the environment. The frequent use of antibiotics in aquaculture not only exacerbates the pollution of antibiotics, but also poses a threat to the health of fish and shellfish. Norfloxacin Lactate (NOR) is an antibiotic widely used in the aquaculture. In the present study, most studies focus on antibiotic drug toxicity and antibiotic resistance crisis. However, the effects of antibiotic especially the quinolones antibiotics on the fish immune system are rarely known.

In this thesis, the consequences of NOR on the nonspecific immune responses (red blood cells (RBCs) count, serum lysozyme (LZM) activity, interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) levels) and specific immune responses (Immunoglobulin M (IgM) levels) of *Takifugu oblongus* (*T. oblongus*) were evaluated after 1, 4, 7 and 10 days of treatment. Three experimental groups (0.5, 5 and 50 mg/L) and control group were established. For the second time, the consequences of NOR on the nonspecific immune responses (RBCs, LZM, IFN- $\gamma$ , Complement 3 (C3)、 Interleukin-8 (IL-8)、 specific immune responses (IgM) and immune-associated genes's (C3 and IgM) expression levels of *Epinephelus coioides* (*E. coioides*) were evaluated after 1, 7, 14, 21 and 28 days of experiment. The first 21 days were set for exposure, and then the fish were moved into clean ocean for 7 days as a recovery experiment. Three experimental groups (0.05, 0.5 and 5 mg/L) and control group were established. The results show:

(1) Exposure of NOR could stimulate or inhibit the non-specific immune response of *T. oblongus* and *E. coioides*. The results reveal a significant decrease of RBCs in both *T. oblongus* and *E. coioides*, and the higher exposure concentration, the greater damage on RBCs. The serum LZM activity of the two species was stimulated in the first 10 days after exposure. The value of *E. coioides* was significantly decreased after 14 days' exposure. Higher concentration of NOR has more obvious effect on the LZM activity. The levels of the two species of fish's IFN- $\gamma$ , *E. coioides*' C3 and IL-8 were stimulated by 0.5 mg/L and 5 mg/L NOR. The stimulating effect of

0.05 mg/L group appeared in the early stage of the exposure, while the effect of 5 mg/L group appeared in the middle to late period of the exposure. No obvious dose-effect relationship showed between the groups.

(2) Exposure of NOR could stimulated the specific immune response of *T. oblongus* and *E. coioides*. The level of total IgM in the head kidney from the two species of fish were higher than the control during the exposure. The stimulating effect of 0.5 mg/L group was observed in the first 4 days of exposure, while the effect of 5 mg/L group was showed after 7 days of exposure. No obvious dose-effect relationship showed between the groups.

(3) NOR caused the significant variation in the expression of immune-associated genes (C3 and IgM) of *E. coioides*' head kidney. The value of the C3 gene expression of *E. coioides* were up-regulated during exposure. While the value of the IgM gene expression of *E. coioides* were inhibited first and then up-regulated repeatedly, indicating that NOR has greater toxicity on IgM than C3.

(4) After 7 days' recovery after exposure, NOR showed a persistent immune toxicity on *E. coioides*. The inhibition of RBCs and serum LZM activity could not recover within 7 days. The levels of the non-specific immune parameters (IFN- $\gamma$ , C3, IL-8) and the specific immune parameter IgM were significantly decreased. The expression of C3 mRNA and IgM mRNA in the experimental groups were significantly inhibited after recovery. These indicated that although *E. coioides* was recovered for 7 days after 21 days' exposure, the immune toxicity it suffered still existed.

Key Words: Antibiotic; Norfloxacin lactate; *Takifugu oblongus*; *Epinephelus coioides*; Immune toxicity.

## 第一章 绪论

### 1.1 抗生素的污染现状

#### 1.1.1 抗生素的使用与迁移

##### 1.1.1.1 概述

抗生素是指各类天然的、人工或半人工合成的能够干扰细菌新陈代谢从而达到杀菌或抑菌效果的物质。天然抗生素主要由细菌、放线菌、半知菌类产生，少数由担子菌、苔藓、绿色植物和动物细胞产生。继 Alexander Fleming 于 1928 年发现历史上第一种抗生素——青霉素后，几千种天然抗生素被陆续探明，其中一部分被人类使用。同时，各类人工或半人工合成抗生素也陆续被研制问世。

抗生素按照抗菌原理不同可分为几大类(Derek Moore., 2017):

(1) 抑制细菌细胞壁合成：头孢菌素类、 $\beta$ -内酰胺类、碳青霉烯类、青霉素类、万古霉素类、崔西杆菌素类、噻吩单酰胺菌素类、多粘菌素类抗生素；

(2) 抑制细菌蛋白合成：大环内酯类、四环素类抗生素、氯霉素类、恶唑烷酮类、林可霉素类、链阳霉素、氨基糖苷类类抗生素；

(3) 抑制细菌 RNA 复制：立复霉素类抗生素；

(4) 抑制细菌 DNA 复制：氟喹诺酮类、甲硝哒唑类抗生素；

(5) 抑制细菌叶酸合成：甲氧苄氨嘧啶、磺胺类、乙嘧啶类抗生素。

(6) 抑制细菌分枝菌酸合成：异烟肼类抗生素；

##### 1.1.1.2 抗生素的使用现状

目前，抗生素的使用范围遍布全世界。WHO(World Health Organization)对抗生素使用量单位的定义为 DID(Defined Daily Dose for 1000 inhabitants per day): 每千人每天的抗生素使用量。据统计，欧盟各成员国抗生素使用量在 8.9-32.6 DID 之间(Cars et al., 2001)。东欧非欧盟国家用于医疗的抗生素总量在 15.3-42.3 DID 之间(Versporten et al., 2014)。与发达国家相比，中国的抗生素 DID 值几近美国和欧洲的 5 倍(Chen et al., 2015)。2013 年，中国生产抗生素总量为 248000 吨，共消耗抗生素约 162000 吨(Ying et al., 2017)。

抗生素的使用分为医用和非医用两种途径。病人通过就诊使用医生处方开出的抗生素是人们熟知的抗生素使用途径之一，由于其抵抗细菌的快速有效性，使

它们成为了医生最爱使用的药物,即使有些病症不需要抗生素也可以获得很好的治疗效果,一些医生仍然坚持使用抗生素防止感染,导致了抗生素成为最被滥用的一种药物。

尽管抗生素在医疗过程中被滥用的问题值得人们关注,但抗生素的非医用使用量也不可小觑。目前,抗生素已普遍使用于畜牧业、水产养殖业、家庭护理等方面:

(1) 抗生素已经被用作生长添加剂大量应用于畜牧业。美国等国家将抗生素投加在饲料或者水中以加快牲畜的生长,提高产量以获得更高的经济效益。值得注意的是,美国用于动物增产的抗生素多于人类的医药用量(Meek et al., 2015)。中国亦是如此,Ying 等人研究得出 2013 年中国消耗的抗生素中 52%用于动物和牲畜,48%用于居民(Ying et al., 2017)。据 Hu 等人统计,中国每年大约投入 97000 吨抗生素用于畜牧业增产,其中 46%用于乡村(Hu et al., 2010)。中国乡村成了最大的抗生素生产和消费地,每年约有 210000 吨抗生素在中国乡村被消耗。鉴于牲畜中的抗生素残留,每年大约有 8700-29000 吨抗生素经牲畜排泄物排出,被当做肥料施用于农田中,进而引发农业抗生素污染(Witte, 1998)。

抗生素抗性的出现引发了人们对动物健康的关注和对畜牧业中是否应继续使用抗生素作为普通添加剂以增产的思考。丹麦从 1990 年代开始不再使用抗生素作为畜牧业增产添加剂。2002 年 WHO 报道了丹麦颁布的此项禁令仅对猪产量有影响,对其他家禽产量没有任何不利影响(WHO, 2002)。经调查,USNAS 得出同样的结论:禁止使用抗生素作为添加剂给美国畜牧业和消费者带来的不利影响是极小的(National Research Council, 1999)。

(2) 抗生素在水产养殖业中的预防性使用普遍存在。人工养殖条件对于水生生物而言并不是长久适宜的环境,大规模的人工养殖环境下,水生生物的免疫系统抵御能力被削弱,面对细菌感染更加脆弱。水产养殖业中抗生素作为预防疾病产生的手段而被广泛应用。抗生素通常被投加在饲料中或直接泼洒在养殖池内,它们并不会被鱼类完全吸收,其中大部分会随着排泄物进入水体,随着养殖废水的排放而进入自然环境当中(Rico and Van den Brink, 2014)。中国是世界上水产养殖业中抗生素使用量最大的国家(FAO Nations, 2012)。

(3) 抗生素在家庭护理中使用频繁。很多家用洗护产品包含杀菌成分,如肥皂、

沐浴露包含的三氯苯氧氯酚、抗细菌合成化合物、抗真菌物和抗过滤性病原体的物质。清洁剂、美容产品、防晒霜、漱口水等产品当中则普遍含有抗菌剂(Meek et al., 2015)。由于抗生素的使用已经渗透进入日常生活的方方面面，生活污水中抗生素污染问题也日益严重。

### 1.1.1.3 抗生素的迁移

抗生素可通过多种途径进入环境中，并最终污染水源和土壤。医用抗生素不能够完全被人类吸收，经过新陈代谢，一大部分抗生素随着排泄物进入污水处理厂或直接排入环境中。畜牧业中添加的抗生素大部分随粪便排放进入环境中，绝大部分未经处理又用作农业肥料，直接进入农田土壤环境中(Sarmah et al., 2006)。水产养殖业废水中亦含有大量未被水生生物吸收的抗生素，直接进入地表水循环。污水处理厂对抗生素的去除效率不高，而有些污水未经处理即被用于农业灌溉。其他非医用抗生素被当做垃圾填埋在地表，经雨水冲刷进入土壤。抗生素在环境中的迁移过程如图 1-1 所示(Homem and Santos, 2011)。

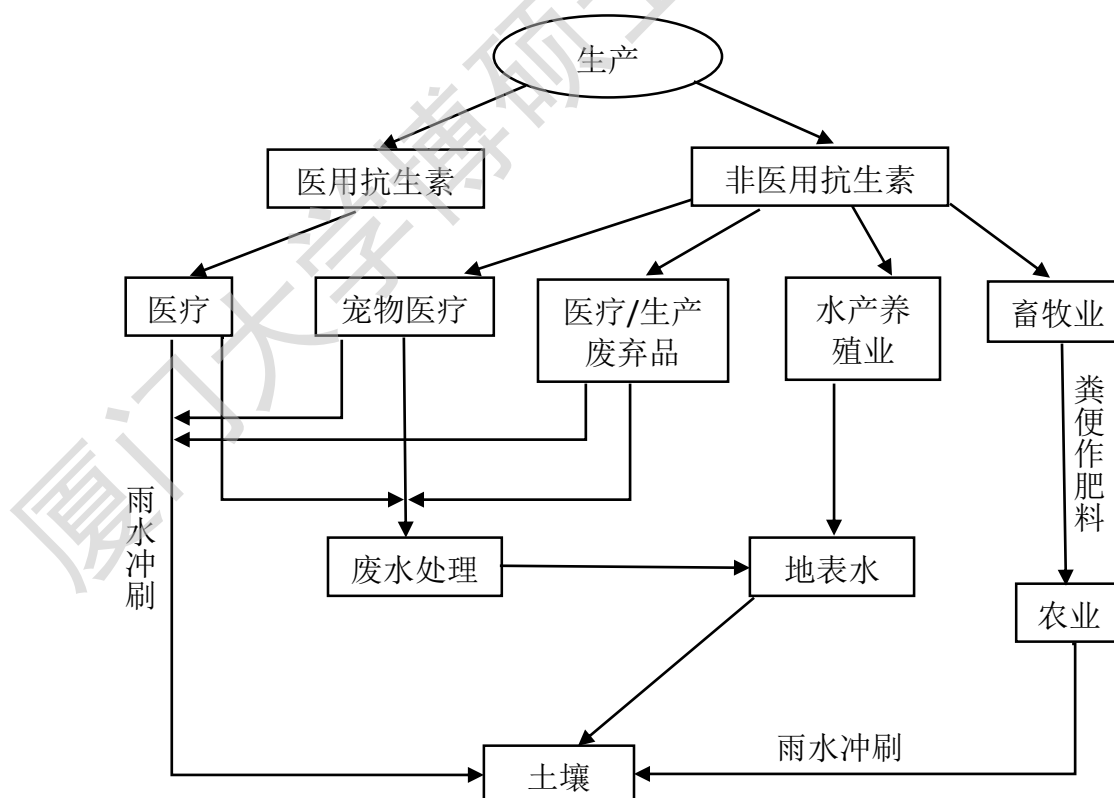


图 1-1 环境中抗生素的迁移

Fig. 1-1 Migration of antibiotics in the environment



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库