

抗红鳍东方鲀盾纤毛虫天然化合物筛选及组织分布研究

周 诚^{1,2} 何嘉乐¹ 田艾迪³ 张诗琪¹ 叶仕根¹ 赵小然^{1*}

(¹大连海洋大学,辽宁大连 116023;

²设施渔业教育部重点实验室,辽宁大连 116023;

³沈阳农业大学食品学院,辽宁沈阳 110866)

摘要 为筛选出抗红鳍东方鲀盾纤毛虫的天然化合物,并评价其对红鳍东方鲀的安全性,选取了20种中药有效成分,在光学显微镜下观察统计药物各浓度梯度在10、30、60 min时对盾纤毛虫的杀灭作用;选择杀虫效果最好的2种药物进行杀虫率检测,通过棋盘法进行联合用药评价;并使用高效液相色谱法研究2种药物在红鳍东方鲀体内的组织分布。结果表明:MNL、NHK 2种化合物与盾纤毛虫作用10 min时,药物浓度为8 μg/mL时可观察到杀虫作用,药物浓度达到32 μg/mL时杀虫作用显著,随着时间延长杀虫作用增加,但二者联用呈拮抗作用;MNL和NHK在红鳍东方鲀肌肉中达到峰值时间分别为0.75、1.00 h,在肝脏均呈现双峰现象且达第1个峰值时间为0.5 h,并分别于3、12 h在受检组织中消除。由此表明,2种天然化合物具有显著的杀虫作用,在一定范围内具有剂量依赖性和时间依赖性,药物吸收快、达峰时间短、消除快,应用中宜单独用药,不宜联用。

关键词 盾纤毛虫;红鳍东方鲀;天然化合物;组织分布

中图分类号 Q936 文献标识码 A

文章编号 1007-5739(2021)02-0178-04

DOI:10.3969/j.issn.1007-5739.2021.02.072

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Screening and Tissue Distribution of Natural Compounds Against *Scuticociliatida ciliates* from *Takifugu rubripes*

ZHOU Cheng^{1,2} HE Jiale¹ TIAN Aidi³ ZHANG Shiqi¹ YE Shigen¹ ZHAO Xiaoran^{1*}

(¹Dalian Ocean University, Dalian Liaoning 116023; ²Key Laboratory of Environment Controlled Aquaculture (KLECA), Ministry of Education, Dalian Liaoning 116023; ³Food Science College, Shenyang Agricultural University, Shenyang Liaoning 110866)

Abstract In order to screen out natural compounds against *Scuticociliatida ciliates* and evaluate the safety to *Takifugu rubripes*, twenty ingredients of traditional Chinese medicine were selected. We observed and evaluated the killing effect of the drugs on *Scuticociliatida ciliates* at 10 min, 30 min and 60 min under the microscope. Two compounds with the best insecticidal effect were selected to detect the insecticidal rates and evaluate the combination index through checkerboard techniques, and HPLC were used to study the tissue distributions of the two compounds in *T. rubripes*. The results showed that when MNL and NHK acted on ciliates for 10 min, the insecticidal effect was observed at a drug concentrations of 8 μg/mL, and the insecticidal effect was significant when the concentrations reached to 32 μg/mL, and the insecticidal effect increased with time, but the combination of the two drugs showed an antagonistic effect. The peak times of MNL and NHK in the muscles were 0.75 h and 1.00 h, and both showed double peaks in the liver and the first peak time was 0.5 h. Besides, the two drugs were eliminated in the tissues at 3 h and 12 h, respectively. Studies indicated that the two natural compounds had significant insecticidal effects, was dose-dependent and time-dependent within a certain range, and possessed fast drug absorption, short peak time, and fast elimination. In application, it was advisable to use drugs alone rather than combined.

Keywords *Scuticociliatida ciliates*; *Takifugu rubripes*; natural compound; tissue distribution

红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)属于脊索动物门硬骨鱼纲鲀形目鲀科东方鲀属,是一种底层肉食性海洋洄游鱼类,主要分布在日本、韩国沿海及中国东海、

黄海和渤海海域。红鳍东方鲀肉质鲜美、营养丰富,市场需求量逐年提高,是中国出口日本和韩国等地的重要出口创汇经济鱼类之一^[1]。红鳍东方鲀在我国的养殖规模不断扩大,养殖水体水质恶化和寄生虫病害频繁暴发等问题也日趋严重,严重影响产业健康发展,其中以盾纤毛虫引起的疾病最典型^[2]。盾纤毛虫隶属纤毛门(Ciliophora)寡膜纲(Oligohymenophorea)盾纤目(Scuticociliatida),是海水养殖中常见且多发的危害性

基金项目 广东省重点研发计划项目(2019B020215001,GM L2019ZD04020)。

作者简介 周诚(1995—),男,湖南益阳人,在读硕士研究生,从事资源利用与植物保护工作。

* 通信作者

收稿日期 2020-08-18

纤毛虫原生动动物,属于组织内寄生的兼性寄生虫,在水中主要摄食悬浮微小颗粒物质(细菌、微藻、原虫等),也可以寄生到软体动物、甲壳类、鱼类等寄主身上进行生长繁殖^[3]。盾纤毛虫病在虾、蟹、鱼、贝等养殖生产中比较常见,红鳍东方鲀在幼苗期、养成期和亲鱼培育期均可以感染盾纤毛虫,一旦感染,传染快、发病率高,可引起红鳍东方鲀大规模死亡,造成严重的经济损失^[4]。在水质条件恶化时虫体数量呈指数型增长,不易彻底杀灭,在感染水产动物期间还会伴随烂鳃症、腹水症和肠炎症等其他细菌性疾病一起发生^[5]。

目前,国内海水养殖生产中治疗盾纤毛虫类病害的有效方法较少,在实际生产中用于防治盾纤毛虫病的药物主要包括高锰酸钾、硫酸铜、硫酸锌及其复配制剂,以及甲醛、戊二醛和二硫氰基甲烷溶液等^[6],但使用违禁药品和滥用药物等现象较普遍。因此,筛选出高效、低毒、低残留和低抗药性的无公害药物防治此类病害迫在眉睫。中药有效成分因具有来源天然、低药物残留、低抗药性和广谱性等优点^[7],符合健康养殖和可持续发展的理念,具有很大的开发应用价值。因此,从中药有效成分方面着手研发安全有效、环境友好的新型药物,对推进水产养殖业绿色发展具有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

试验用红鳍东方鲀购自大连天正实业有限公司,体重(10±1)g/尾,采用循环水养殖系统进行饲养。试验所用的盾纤毛虫分离自患病红鳍东方鲀溃烂处,通过18S rDNA分子鉴定,由大连海洋大学海珍品疾病防控重点实验室成功保种传代。试验共选用20种天然化合物标准品(纯度>99%),均购于成都瑞芬思生物科技有限公司。试验用CCK试剂,由北京全式金生物技术有限公司生产。

试验器材有:酶标仪,由美国Biotek仪器公司生产;高效液相色谱仪,由日本岛津公司生产;C₁₈色谱柱,由美国Thermo Fisher Scientific生产。

1.2 试验方法

1.2.1 杀虫药物筛选。虫体接种于海水肉汤培养基中驯化培养,用甲醛固定计数,具体参照姜沅君等^[8]方法。在96孔板中加入盾纤毛幼虫悬液(8 000只/50 μL),并依次加入50 μL不同浓度药物,使药物终浓度分别为8、16、32、64、128 μg/mL,以相同体积的无菌海水和甲醛溶液作为阴性和阳性对照。在光学显微镜下分别于10、30、60 min时观察并记录各药物不同浓度下的杀虫效果(死亡程度用“+”表示;无死亡用“-”表示),每组均进行3次重复试验。

1.2.2 杀虫率检测。将盾纤毛虫和选出的有效药物依照上述方法加入96孔板,作用10 min后加入CCK试剂,避光反应30 min后使用酶标仪测得样品在450 nm波长下的光密度(Optical Density, OD值),并计算药物的杀虫率。计算公式如下:

$$\text{杀虫率}(\%) = (\text{OD}_{\text{样本}} - \text{OD}_{\text{阴性}}) / (\text{OD}_{\text{阳性}} - \text{OD}_{\text{阴性}}) \times 100$$

1.2.3 联合用药试验。在96孔板中以相同方法加入盾纤毛虫悬液,根据微量棋盘稀释法加入NHK和MNL不同浓度混合药液^[9]。NHK浓度为128、64、32、16、8、4、2 μg/mL, MNL浓度为2、4、8、16、32、64、128 μg/mL,将NHK各个浓度分别与MNL的各个浓度混合,共计49组。测定杀虫率后计算不同浓度比例联合用药的CI指数(Combination Index),用来判断不同浓度比例下2种药联合用药对杀灭盾纤毛虫的相互作用关系,计算公式如下:

$$CI = D_A / IC_{X,A} + D_B / IC_{X,B}$$

式中,A、B代表2种不同的药物,IC_{X,A}和IC_{X,B}是2种药物单独使用使抑制率达X%时的药物浓度,D_A和D_B是2种药物联用使抑制率达X%时的药物浓度^[10]。

1.2.4 药物在红鳍东方鲀体内的组织分布试验。具体如下:

(1)标准曲线的制备。使用生理盐水将受试药物分别稀释至150、200、250 μg/mL,将药液与乙腈混合振荡、离心并过滤后,使用高效液相色谱仪对样品进行检测^[11]。色谱条件:C₁₈色谱柱,流动相为甲醇:水(78:22),进样量10 μL,流速1.0 mL/min,检测波长294 nm,柱温25℃。根据数据进行标准曲线制备,计算回归方程及方差。

(2)组织分布的测定。使用无菌生理盐水溶解受试药物,以50 mg/kg 0.1 mL/尾对红鳍东方鲀进行注射,给药后分别于0.25、0.50、0.75、1.00、1.50、2.00、3.00、4.00 h等时间点剖取试验动物肝脏和肌肉组织,样品称重后按1:2比例加入生理盐水进行研磨匀浆,获得的匀浆液与乙腈混合、离心并过滤,样品处理方法及色谱条件同上。根据HPLC检测数据绘制组织分布曲线。

1.2.5 数据处理。采用SPSS 19.0软件进行统计分析和P值计算,组间差异分析采用独立样本t检验。P<0.05(*)和P<0.01(**)分别表示差异显著和差异极显著。所有样本均设置3个平行,并使用均值和标准差制图。

2 结果与分析

2.1 抗盾纤毛虫天然化合物的筛选

由表1可知,受试20种天然化合物中大多数药物如大黄素、大黄酸、没食子酸、苦参碱、槟榔碱、小檗碱

等在 60 min 内对盾纤毛虫均无杀灭作用,只有 MNL、NHK 和 THY 3 种药物具有杀虫效果,其中,MNL 与 NHK 杀虫效果更为明显,而 THY 效果不佳,故选择前 2 种药物进行杀虫率测定、联合用药及组织分布试验。如图 1 所示,当 MNL 浓度为 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时盾纤毛虫死

亡率为 53.6%,当 MNL 浓度增加至 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时杀虫率达到 96.8%;而当 NHK 浓度为 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时盾纤毛虫死亡率为 64.7%,在浓度 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 条件下杀虫率为 96.6%,表明此 2 种药物的杀虫作用在一定范围内具有剂量依赖性和时间依赖性。

表 1 天然化合物对盾纤毛虫的杀虫效果

| 药物 | 时间/ min | 不同浓度下的杀虫效果 | | | | |
|-----|------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| | | 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ | 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ | 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ | 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ | 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ |
| MNL | 10 | + | ++ | +++ | +++ | +++ |
| | 30 | + | ++ | +++ | +++ | +++ |
| | 60 | ++ | ++ | +++ | +++ | +++ |
| NHK | 10 | + | ++ | +++ | +++ | +++ |
| | 30 | + | ++ | +++ | +++ | +++ |
| | 60 | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| THY | 10 | - | - | - | - | - |
| | 30 | - | - | + | + | + |
| | 60 | - | + | + | ++ | ++ |

注:“+++”表示 100%死亡,“++”表示死亡大于 50%、“+”表示死亡小于 50%、“-”表示无死亡。

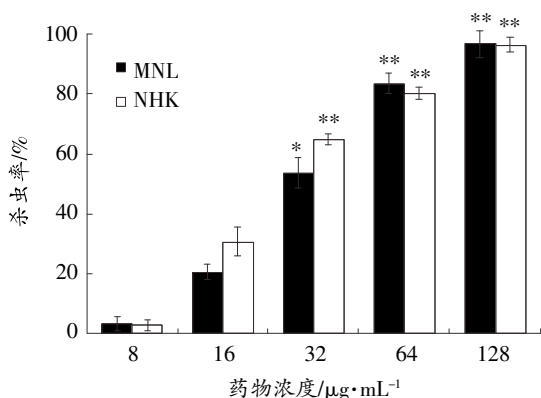


图 1 2 种药物的杀虫作用

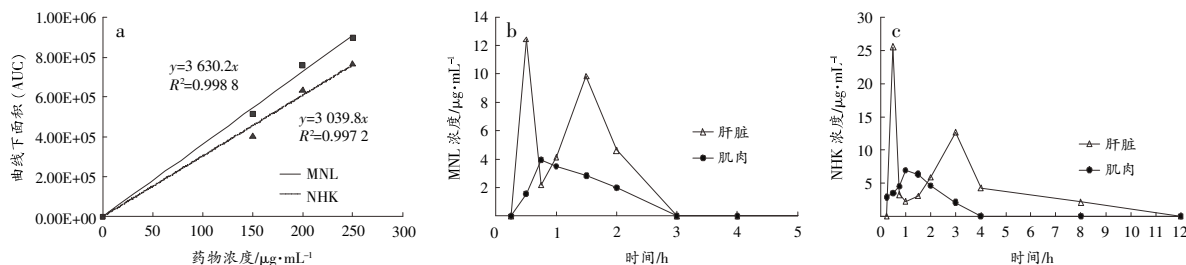
2.2 联合用药评价

通过计算杀虫率分别为 50%和 90%时的 CI 指数,得到不同浓度比例联合用药下的 CI 值:CI_(50%)=1.66, CI_(90%)=1.33。表明联合用药达到良好的杀虫效果时 CI 指数数值在 1~2 之间,即药物 MNL 和 NHK 联合使用

呈拮抗作用。因此,二者联合用药不能提高杀虫效果,在生产应用中应选择单独用药。

2.3 2 种药物在红鳍东方鲀体内的组织分布

绘制药物浓度与峰面积的标准曲线,结果表明,MNL 和 NHK 在 0~250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内与色谱峰面积均有良好的线性关系,见图 2(a)。药物进入红鳍东方鲀体内后,均迅速分布于肌肉和肝脏组织中。MNL 在肌肉中 0.75 h 达到峰值;在肝脏中 0.5 h 出现第 1 个浓度峰值,随后在 1.5 h 时达到第 2 个峰值,之后药物浓度持续下降,直至 3 h 之后在组织中代谢完全,见图 2(b)。NHK 在肌肉中 1 h 时达到峰值,4 h 时完全消失;而在肝脏中 0.5 h 时出现第 1 个峰值后,于 3 h 时出现第 2 个峰值,之后药物含量持续下降在 12 h 后消失。2 种药物均在肝脏中出现 2 个峰浓度,表明其在红鳍东方鲀体内存在肠肝循环,且 NHK 的生物利用度高于 MNL。



注:a 为 2 种药物的标准曲线;b 为 MNL 的组织分布曲线;c 为 NHK 的组织分布曲线。

图 2 药物的标准曲线及组织分布

3 结论与讨论

3.1 盾纤毛虫病防治药物的筛选

盾纤毛虫可以通过多种途径进入养殖水体致使多种海水鱼类、对虾和刺参等动物发病,严重为害海

水经济动物^[5]。相关研究表明,感染盾纤毛虫的红鳍东方鲀病鱼往往有以下症状:体表黏液增多,附着分布不规则的白色絮团,病鱼活力减弱、摄食量降低甚至绝食;严重时体表及鳍基部发红或糜烂,鳃褪色出血

糜烂、鳃盖内侧红肿,皮肤和皮下肌肉组织出血或坏死性溃疡,有的病鱼肝脏出血或糜烂,肠道松弛,腹腔积水^[2]。目前,国内红鳍东方鲀的养殖大部分都是网箱高密度养殖,在这种工厂化集约养殖的环境中,水体极易遭受污染,水中的病原体也很容易侵入病鱼造成继发感染,最终导致养殖鱼类大量死亡,给企业带来严重损失。长期以来,由于水产养殖从业人员缺乏绿色安全健康的养殖意识,在实际生产中,滥用药和用禁药的现象很普遍。这样一来,一方面会导致大量鱼体出现药物残留现象,对食品安全构成严重威胁;另一方面会导致水产动物病原产生耐药性,并破坏养殖水体环境的微生态平衡。因此,开发出疗效好、低残留和低成本天然药物替代抗生素等化学药品应用于水产动物病害防控迫在眉睫^[3]。随着中药临床的广泛应用及其联合用药的增多,筛选和研发对水产养殖安全有效、毒副作用小、体内不易残留的天然药物,日益受到关注并逐渐成为研究热点。

许多中药单方或复方制剂不仅具有杀虫和抑菌等作用,而且能够改善养殖动物的免疫状态,提高机体自身的抗菌防病能力,是动物性食品生产过程中各种化学类和人工合成抗生素的理想替代物^[4]。但长期以来,由于中药成分复杂,结构和作用机制不明,在基础研究和实践中备受局限。本试验筛选出的MNL和NHK均是传统中药的活性成分,结构明确,利于将来对其药效学、药动学和作用机制等深入研究。2种药物对盾纤毛虫都具有显著的杀灭作用,但联合用药试验结果表明,二者联用表现为拮抗效应,在实际应用中不建议联用,这也是在以往对中药粗提物的研究中无法阐明的。

3.2 MNL、NHK 红鳍东方鲀体内的组织分布

药代动力学性质是新药研发中的重要指标之一,理想的药物除满足药效学和毒理学需求之外,还应该具有良好的生物利用度和足够的作用时间^[5]。MNL和NHK进入体内后能够快速分布于各组织器官并且达到峰浓度,在红鳍东方鲀组织中呈先升后降的趋势,而且在肝脏呈现双峰现象,4~12 h后药物即可排泄完全,表明其消除速率快,不易产生药物残留。2种药物在肝脏中含量达峰值时间短且峰值明显高于肌肉组织,表明药物在血管丰富的组织中吸收好,推测此2种药物在组织中的分布速率与残留浓度、血流量有关。

肠肝循环是药物排泄和重吸收的一种形式,在给药曲线中表现为多个峰和更长的表观半衰期,它能延长药物在机体内的存留时间,维持药物在组织器官的有效浓度,对提高疗效有一定的应用价值。值得注意

的是,出现这一特殊的药代动力学现象可能与化合物特定结构有关,肠肝循环相当于一个“自体给药”过程,会提高药物的生物利用度,也会增加药物-药物相互作用(DDI)的可能性^[6]。

4 参考文献

- [1] 王盛南,胡子文,余云登,等.红鳍东方鲀不同生长时期脑和肌肉的转录组比较分析[J/OL].基因组学与应用生物学: 1-7[2020-07-30].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1369.Q.20200428.1709.008.html>.
- [2] 王会芳.红鳍东方鲀盾纤虫病的研究[J].科学养鱼,2011(11):53-54.
- [3] IGLESIAS R, PARAMÓ A, ALVAREZ M F, et al. *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatida) as the causative agent of scuticociliatosis in farmed turbot *Scophthalmus maximus* in Galicia (NW Spain)[J]. *Dis Aquat Org*, 2001, 46(1): 47-55.
- [4] 崔青曼,袁春营,李春岭,等.主要海水养殖鱼类白点病和盾纤毛虫病防治技术[J].水利渔业,2007(6):85-87.
- [5] 高延奇,王森,刘娟,等.三种宿主源盾纤毛虫的分离鉴定及体外培养研究[J/OL].大连海洋大学学报: 1-12[2020-07-30].<https://doi.org/10.16535/j.cnki.dlhyxb.2020-067>.
- [6] 常志强,陈钊,李泽鹏,等.中兽药驱虫复方制剂防治海水养殖中盾纤毛虫的临床试验研究[J].中兽医医药杂志,2019, 38(5):5-9.
- [7] 林能锋,郑晨艳,王侯杰,等.中草药浸出液体外驱杀两种水产致病性盾纤毛虫的研究[J].福建畜牧兽医,2017,39(5): 13-15.
- [8] 姜沅君,黄宇希,高延奇,等.抗红鳍东方鲀盾纤毛虫中草药制剂的筛选与应用[J].现代农业科技,2018(24):228-229.
- [9] 郑宝英,张杰.抗生素的联合用药[J].中国抗生素杂志,2007(6):324-328.
- [10] ZHAO L, WIENTJES M G, AU J L. Evaluation of combination chemotherapy: integration of nonlinear regression, curve shift, isobologram, and combination index analyses[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(23): 7994-8004.
- [11] 邹黎.阿戈美拉汀的药代动力学和组织分布研究[D].重庆:重庆医科大学,2012.
- [12] 王讷言,叶仕根,杜明洋,等.一例红鳍东方鲀盾纤毛虫病的诊治[J].科学养鱼,2017(2):71.
- [13] 张永明.大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)盾纤毛虫病的病理学观察及中草药防治效果研究[D].青岛:中国海洋大学,2009.
- [14] 郑尧,陈家长.水产动物中草药的应用基础[J].中国农学通报,2018,34(8):123-128.
- [15] 江力宣,闫海英,阳盛洪,等.药代动力学研究在新药研发中的应用[J].药学实践杂志,2006(5):260-263.
- [16] ZHENG B, WANG C, SONG W, et al. Pharmacokinetics and enterohepatic circulation of jervine, an antitumor steroidal alkaloid from *Veratrum nigrum* in rats[J]. *J Pharm Anal*, 2019, 9(5):367-372.