学 校 代 码 ： 1 0 2 6 4

研究生学号： D090101005

**上 海 海 洋 大 学博 士 学 位 论 文**

**题 目：**

**基于γ-氨基丁酸 A 型受体的鱼类受渔药影响的研究**

**英文题目： The research of effects caused by fishery drugs based on type A of gamma-aminobutyric acid receptor**

**专** 业： **水 产 养 殖 研究方向：** **水 产 动 物 医 学姓** 名： **阮 记 明**

**指导教师：** **杨先乐 教授**

**二〇一四 年 六 月**

**上海海洋大学博士学位论文答辩委员会成员名单**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 姓名 | 工作单位 | 职称 | 备注 |
|  |  |  | 主席 |
|  |  |  | 委员 |
|  |  |  | 委员 |
|  |  |  | 委员 |
|  |  |  | 委员 |
|  |  |  | 委员 |
|  |  |  | 委员 |
|  |  |  | 秘书 |
| 答辩地点 |  | 答辩日期 |  |

**上海海洋大学学位论文原创性声明**

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：

日期： 年 月 日

**上海海洋大学学位论文版权使用授权书**

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权上海海洋大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

本学位论文属于

保密 □ ，在 年解密后适用本版权书。 不保密 □

学位论文作者签名： 指导教师签名：

日期： 年 月 日 日期： 年 月 日

基于 *γ*-氨基丁酸 A 型受体的鱼类受渔药影响的研究

摘 **要**

*γ-*氨基丁酸（Gama-Aminobutiric acid, GABA）是机体内一种主要的抑制性神经递质，主要在中枢神经系统中分布。在体内，谷氨酸在谷氨酸脱羧酶

（Glutamatedecarboxylase, GAD）作用下，不可逆的脱去α位上的羧基形成GABA，生成的GABA在GABA转氨酶（GABA transaminase, GABA-T）催化作用下生成琥珀酸半醛。其中GAD存在GAD65和GAD67两种同工酶。

γ-氨基丁酸受体（GABA receptor, GABAR）是指突触膜上能识别和结合GABA的部位，当GABA与其结合后，细胞膜离子通透性发生改变，从而引起神经发生抑制。GABAR根据对激动剂和抑制剂的敏感性不同分为GABAAR(ARs)、GABABR

（BRs）和GABACR（CRs）三个亚型。GABAAR是由膜蛋白组成的五聚体，为离子通道型受体，其中α1β2γ2是ARs最主要的一种亚型，且每个α1β2γ2亚型中均含有

2个α1和β2亚基。

目前，关于淡水鱼类GABAAR以及渔药对GABAAR的影响等研究还未见有相关报道。异育银鲫为我国广泛养殖的大宗淡水鱼类之一；因此，本文以异育银鲫为研究对象，采用RT-PCR、qPCR以及HPLC等方法研究了异育银鲫体内GABAAR、

GABA合成代谢酶的组织分布特点，并进行了基于GABAA受体的鱼类受阿维菌素及双氟沙星影响的研究。

**第一部分异育银鲫体内GABAA受体及其GABA相关合成代谢酶研究**

以异育银鲫为研究对象，首先运用RT-PCR分析了GABAA受体β2亚基（AR*β*2）的a、b亚型在异育银鲫体内的分布情况。结果显示在异育银鲫中枢神经系统（端脑、中脑、小脑、延脑）和外周神经组织（肝脏、肾脏、心脏、肠道、鳔、鳃、肌肉及鳍条）均有A型GABA受体β2亚基a、b亚型（AR*β*2a和AR*β*2b）mRNA表达；另外，GAD65、GAD67和GABA-T在上述组织中均有表达。

其次运用荧光定量PCR方法对异育银鲫不同组织中ARβ2a、ARβ2b、GAD和GABA-T基因mRNA的表达情况进行了定量研究。结果发现ARβ2a、ARβ2b、GAD和GABA-T mRNA主要在大脑组织中表达，外周组织表达极少；但是GABA-T除了在大脑中大量表达之外，还在外周组织特别是肝脏组织中有相当一部分的GABA-T表达。另外，研究不同发育阶段对受体表达的影响结果显示，当异育银鲫体重发生变化时，组织中的ARβ2a、ARβ2b的表达也发生了改变。

I

**第二部分基于GABAA受体的异育银鲫受阿维菌素类药物影响研究**

阿维菌素（Avermectin, AVM）是水产养殖上广泛使用的寄生虫防治药物之一。为了研究基于GABAA受体的阿维菌素类药物对鱼类的影响，本文首先测定了AVM对异育银鲫急性毒性以及不同浓度下各组织中AVM残留情况。结果显示：AVM对体重为60.04±5.02 g的异育银鲫24 h、48 h和96 h半数致死浓度（LC50）分别为0.127、

0.071和0.039 mg/L，因此推算得到AVM安全浓度（SC）为0.0039 mg/L. AVM组织残留结果显示，AVM按照24 h、48 h及96 h半数致死浓度（0.127、0.071、0.039 mg/L）及安全浓度（0.0039 mg/L）泼洒用药后，均能从异育银鲫大脑组织中检测出有AVM残留，且大脑中AVM残留量与用药浓度呈正相关，其中24 h LC50浓度下大脑中AVM含量最高为0.292±0.005μg/g。结果表明，在上述用药浓度下，AVM均能渗透血脑屏障进入异育银鲫大脑。

AVM用药后对异育银鲫ARβ2亚基影响结果显示，AVM按照24 h LC50、48 h LC50、96 h LC50及安全浓度（0.127、0.071、0.039、0.0039 mg∙L-1）泼洒用药后，中枢神经系统中的端脑、中脑、小脑、延脑四种组织中ARβ2a和ARβ2b mRNA在不同用药浓度及不同时间点，均表现为极显著下调，且延脑是ARβ2a 和ARβ2b

mRNA表达下调最为明显的组织。而外周组织中，肝脏、肾脏组织中ARβ2a mRNA表达显著上调，而肌肉组织中ARβ2a mRNA显著下调；而ARβ2b除肾脏组织在24h（96 h LC50）时间点上显著上调之外，肝脏、肾脏、肌肉三种组织ARβ2b mRNA表达均表现为极显著下调。且结果显示，肝脏、肾脏、肌肉三种外周组织中ARβ2a和ARβ2b mRNA表达的上、下调幅度与AVM用药浓度无关。上述结果表明AVM用药后，异育银鲫体内ARβ2mRNA表达量呈下降趋势。

另外，结果显示AVM用药后对异育银鲫GAD、GABA-T基因mRNA表达也产生了影响。GAD方面，AVM根据上述浓度泼洒用药后，大脑组织中，端脑、中脑、小脑和延脑四种组织中的GAD65和GAD67 mRNA表达均表现为极显著下调，且延脑是GAD65和GAD67 mRNA下调最为明显的组织。而在外周组织中，除了24h

（96h LC50）时间点上GAD65和GAD67 mRNA表达显著上调之外，肝脏、肾脏、肌肉三种外周组织中的GAD65和GAD67 mRNA在不同用药浓度及不同时间点上均表现为极显著下调，其中肌肉组织为GAD65和GAD67 mRNA表达下调最为显著的外周组织。GABA-T方面，AVM在上述用药浓度条件下，端脑、中脑、小脑延脑四种大脑组织中的GABA-T mRNA表达均显著下调；外周组织中除了肾脏组织在24h（96 h LC50）时GABA-T mRNA表达显著上调之外（1.32±0.07倍），其余均表现为极显著下调。AVM用药后对异育银鲫GAD、GABA-T基因mRNA表达影响的结果总体表明AVM用药后，异育银鲫体内GABA的合成及代谢均是减缓的。

II

第三部分基于GABAA受体的异育银鲫受氟喹诺酮类药物影响研究

同样，为了研究基于GABAA受体的异育银鲫受氟喹诺酮类药物的影响，本文首先测定了DIF（其中一种氟喹诺酮类药物）对异育银鲫急性毒性以及不同剂量条件下各组织中DIF组织残留情况。结果显示：DIF对体重为60.04±5.02 g的异育银鲫在单次前肠投喂方式给药条件下96 h半数致死剂量（LD50）为2840 mg/kg，根据渔药毒性分级标准判断其为低毒物质。DIF组织残留方面，异育银鲫大脑组织在96 h LD50第96h时及临床用药剂量上限（20 mg/kg）的24个时间点上均能检测出

DIF的存在，说明DIF渗透通过异育银鲫BBB而进入其大脑组织。另外，DIF采用临床用药剂量上限（20 mg/kg）给药后，大脑、肝脏、肾脏及肌肉四种组织中以大脑组织中的药物消除过程最为平缓；且到试验第960 h，大脑组织中DIF含量最高（0.392±0.007μg/g）。因此可以推测异育银鲫大脑组织可以作为DIF药物残留分析的靶组织。

DIF用药后对异育银鲫ARβ2亚基影响方面，DIF在96 h LD50及20 mg/kg用药条件下，端脑、中脑、小脑、延脑组织中的ARβ2a mRNA的表达均极显著下调；对ARβ2b mRNA的表达除了延脑20 mg/kg用药条件下表达下调之外，端脑、中脑、小脑中的表达均上调。其中端脑是鱼类高级运动中枢，由此可以推测DIF所引起的神经兴奋可能是通过对ARβ2b mRNA的表达的上调实现的。外周组织中，肝脏、肾脏和肌肉中ARβ2a和ARβ2b mRNA表达均极显著上调，其中以对肌肉组织中的表达影响最为明显。上述结果表明DIF用药后，异育银鲫体内ARβ2 mRNA表达量总体呈增加趋势。

对异育银鲫GAD基因影响方面，脑组织在DIF（96 h LD50）用药条件下，端脑、中脑、小脑、延脑组织中GAD65和GAD67 mRNA的表达显著上调或者极显著上调；而20 mg/kg用药下，DIF对GAD65和GAD67 mRNA的表达均下调。由此可以推论：在96 h LD50用药条件下，大脑中的GABA的合成量是增加的，而在20 mg/kg用药下各个时间点GABA的合成减少的。DIF对异育银鲫GABA-T基因影响方面，在96 h

LD50用药条件下，端脑、中脑、小脑、延脑、肝脏、肾脏和肌肉组织中GABA-T mRNA的表达均极显著上调。结果表明在96 h LD50 DIF用药条件下，上述各组织中GABA的代谢是极显著加强的。

综上，研究发现ARβ2（a、b亚型）、GAD及GABA-T在异育银鲫中枢神经系统的端脑、中脑、小脑、延脑和外周神经组织的肝脏、肾脏、心脏、肠道、鳔、鳃、肌肉及鳍条等12部位均有分布，且上述基因的表达均主要集中在中枢神经系统中。基于GABAA受体的鱼类受药物影响结果表明，阿维菌素及双氟沙星绝大多数情况下能对受体的下调表达影响。同样AVM、DIF用药后对异育银鲫体内GAD及

III

GABA-T也能产生影响，但二者所产生的影响难以对机体内GABA含量变化加以判断。

**关键词：**γ-氨基丁酸； γ-氨基丁酸A型受体；谷氨酸脱羧酶； GABA转氨酶；阿 维菌素；双氟沙星

IV

**The Research of Effects Caused by Fishery Drugs Based on Type A of Gamma-Aminobutyric Acid Receptor**

Abstract

Gamma-aminobutyric acid (GABA) is an important inhibitory neurotransmitter which mainly distributs in the central nervous system (CNS). In the body, GABA is synthesized from glutamate irreversibly and metabolized to succinic semialdehyde by glutamic acid decarboxylase (GAD) and GABA transaminase (GABA-T), respectively. And GAD has two isoforms, namely GAD65 and GAD67.

Gamma-aminobutyric acid receptors (GABA receptor, GABAR) refer to the sites which can identify and combine with GABA on synaptic membranes. After combined with GABA, ion permeability of cell membrane changed, and that would lead to neural inhibited consequently. According to sensitivity difference to agonists and inhibitors, GABARs have three subtypes, namely GABAAR, GABABR and GABACR. GABAA receptors are ligand-operated chloride channels that are assembled from five subunits in a heteropentameric manner, which belong to the cys-loop ligand-gated ion channel family, andα1β2γ2 is the predominant GABAA receptor subtype which has two copies ofα1 andβ2 in each subunit.

To date, informations about distributions and quantities of GABAA receptors in aquatic animals and effects of fishery drugs on expressions of GABAA receptors are still limited. For *carassius auratus gibelio* is the one of widely bred freshwater fish species in China, *C. auratus gibelio* was employed in this study. Then by using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and quantitative real-time PCR (qPCR), and high performance liquid chromatography (HPLC), the tissue specific distributions and quantitative detections of GABAAR were executed firstly. And researches of effects caused by avermectin (AVM) and difloxacin (DIF) based on type A of gamma-aminobutyric acid receptors were conducted secondly.

**SectionⅠ: Distributions and quantitative detections of GABAR** a**nd the enzymes relate to GABA in *C. auratus gibelio***

Firstly, the tissue specific distributions of GABAARβ2a (AR*β*2a) and GABAARβ2b (AR*β*2b) were study with RT-PCR technique in *C. auratus gibelio*. Results showed that GABAARβ2a and GABAARβ2b genes expressed in both brain and peripheral organs such as liver, kidney, heart, intestine, swim bladder, gill, muscle and fin. In addition, GAD65 and GAD67, and GABA-T genes also expressed in these tissues mentioned above.

i

Secondly, the mRNA expressions of ARβ2a, ARβ2b, GAD, and GABA-T of different tissues and the expression differences of ARβ2a and ARβ2b between two developmental stages were quantified in *C. auratus gibelio*. Results showed that the majorities of ARβ2a, ARβ2b, GAD, and GABA-T were all mainly synthesized in brain. However, a considerable amount of GABA-T was secreted from the peripheral tissues, especially in the liver. Moreover, the expression of ARβ2a and ARβ2b genes in different tissues varied with body weight changed.

**SectionⅡ: researches of effects caused by Avermectin (AVM) based on type A of GABAR in *C. auratus gibelio***

Avermectin (AVM) is a widely used drug for parasite prevention and controlling in aquaculture. In order to research the effects caused by AVM based on type A of GABAR in fish, the acute toxicity of AVM to *C. auratus gibelio* and the tissue residuals of AVM in *C. auratus gibelio* were detected in this section. Results showed that the median lethal concentrations (LC50) of AVM at 24 h, 48 h and 96 h to *C. auratus gibelio*(60.04±5.02 g body weight) were 0.127, 0.071 and 0.039 mg/L respectively, So safe concentration (SC) of AVM was 0.0039 mg/L. And the existences of AVM in the brain of *C. auratus gibelio* were detected under the median lethal concentrations of AVM at 24 h, 48 h and 96 h and its safety concentration (0.0039 mg/L). The brain residual of AVM under 24 h LC50 at 24 h was 0.292±0.005μg/g which was the highest one. Furthermore, the AVM contents in brain of *C. auratus gibelio* have positive correlations with the initial drug concentrations. The results showed that AVM could penetrate through blood brain barrier into brain of *C. auratus gibelio* under different drug concentrations.

At the same time, the results showed that the expressions of ARβ2a and ARβ2b genes in cerebrum, midbrain, medulla oblongata and cerebellum of CNS were most significant decreased (*P*<0.01) at different concentrations and different time points after AVM used in *C. auratus gibelio*, and cerebellum was the tissue in which the expressions of ARβ2a and ARβ2b genes were lowestly down-regulated. But in the peripheral tissues, the expressions of ARβ2a gene were increased significantly (*P*<0.01) in liver and kidney, while it's expressions in muscle were significant decreased (*P*<0.05). Meanwhile, the expressions of ARβ2b gene in liver, kidney and muscle were most significantly down-regulated except that in kidney under 96 h LC50 at 24 h, and the changes of ARβ2a and ARβ2b genes happened in liver, kidney and muscle have no correlation with the concentrations of AVM. The results mentioned above showed that expressions of ARβ2 gene have decline trend after AVM processed in *C. auratus gibelio*.

What's more, there also showed that the expressions of GAD and GABA-T

ii

Genes were affected by AVM in *C. auratus gibelio*. To GAD, the expression of GAD65 and GAD67 genes were most significantly down-regulated in the tissues of CNS detected in this paper, and medulla oblongata was the organ which the expressions of GAD65 and GAD67 genes were most significantly down-regulated. However, the expressions of GAD65 and GAD67 genes in liver, kidney and muscle were most significantly down-regulated except happened at 24 h with 96 h LC50 at which the expressions of GAD65 and GAD67 genes were increased significantly and the down-regulations happened in muscle were most obvious. To GABA-T, the expressions of GABA-T genes in erebrum, midbrain, cerebellum and medulla oblongata of CNS in

*C. auratus gibelio* were all decreased significantly (*P<0.05*). However, the expressions of GABA-T genes in liver, kidney and muscle were decreased significantly (*P<0.05*) except happened in kidney at 24 h with 96 h LC50 which was significant up-regulated. All the results mentioned above indicated that the synthesis and metabolism rates of GABA were decreased.

**SectionⅢ: researches of effects caused by Fluoroquinolones (FQs) based on type A of GABAR in *C. auratus gibelio***

In order to research the effects caused by FQs based on type A of GABAR in fish, the acute toxicity of DIF (one kind of FQs) to *C. auratus gibelio* and the tissue residuals of DIF in *C. auratus gibelio* were detected firstly in this section. The results showed that the median lethal dose (LD50) of DIF at 96h to *C. auratus gibelio* with 60.04±5.02 g body weight was 2840 mg/kg, and the drug could be judged as a kind of low toxic substances to *C. auratus gibelio*. And the detections of DIF in the brain at different time points with two drug doses indicated that DIF could penetrate through blood brain barrier into the brain of *C. auratus gibelio*. In addition, the concentration-time curve in brain was the gentlest one in the four organs with 20 mg/kg. Combining with the result there has a highest residual content (0.392±0.007 μg/g) of

DIF in brain at 960th h, it would inferred that brain could used as the target tissue for

Drug residue analysis.

The results showed that the expressions of ARβ2a genes in cerebrum, midbrain, cerebellum and medulla oblongata of CNS were all most significantly decreased (*P<0.05*) in *C. auratus gibelio* with 96h LD50 and 20 mg/kg of DIF. But for ARβ2b, the expressions in telencephalon, mesencephalon and cerebella were up-regulated except that the expression changed in medulla oblongata. Cerebrum is the senior sports center in fish, so it may be speculated that the increasing expression of ARβ2b gene could lead to nerve excitability in *C. auratus gibelio*. In the peripheral tissues, the expressions of ARβ2a and ARβ2b genes in liver, kidney and muscle were all most significant increased especially that in muscle. All results showed that the

iii

Expression of ARβ2a genes showed increasing trends in *C. auratus gibelio* after the use of DIF.

And to GAD, the expressions of GAD65 and GAD67 genes in telencephalon, mesencephalon, cerebella and medulla oblongata of CNS were increased or most significantly increased with 96 h LD50 of DIF, but all declined with 20 mg/kg of DIF. So it could be speculated that in brain of *C. auratus gibelio*, the synthesis of GABA was increased after the use of DIF with 96h LD50, while the situation was reversed with 20 mg/kg. To GABA-T, the expressions of GABA-T genes both in CNS and in the peripheral tissues detected in this paper were all most significantly increased with 96h LD50. This indicated that the metabolisms of GABA in those organs were enhanced after the use of DIF with 96 h LD50.

In conclusion, although ARβ2a, ARβ2b GAD, and GABA-T genes were all found distributing in CNS (telencephalon, mesencephalon, cerebella, medulla oblongata) and in peripheral organs (liver, kidneys, heart, intestine, swim bladder, gill, muscle and fin), but the vast majority of them were secreted in the former. The researches of effects caused by fishery drugs based on type A of GABAR showed that, in vast majority of cases, the expressions of the receptors were down-regulated which was caused by AVM and DIF in *C. auratus gibelio*. And the expressions of GAD and GABA were also affected by AVM and DIF, but it was still hard to judge the content changes of GABA within body.

KYE WORDS amma-aminobutyric acid; A type of GABA receptor; glutamic acid decarboxylase; GABA transaminase; avermectin; difloxacin

iv

目 录

[摘](#_Toc686599930)[要](#_Toc686599930) 3

[Abstract](#_Toc686599931) 5

[引 言](#_Toc686599932) 9

[第一章 文献综述](#_Toc686599933) 9

**[1.1](#_Toc686599934)** [γ](#_Toc686599934)**[-](#_Toc686599934)**[氨基丁酸](#_Toc686599934) 9

**[1.1.1](#_Toc686599935)****[GABA](#_Toc686599935)**[理化性质](#_Toc686599935) 10

**[1.1.2](#_Toc686599936)** [γ](#_Toc686599936)**[-](#_Toc686599936)**[氨基丁酸体内过程](#_Toc686599936) 10

**[1.1.3](#_Toc686599937)****[GABA](#_Toc686599937)** [Th理作用](#_Toc686599937) 10

**[1.1.4](#_Toc686599938)****[GABA](#_Toc686599938)**[临床应用](#_Toc686599938) 11

**[1.2](#_Toc686599939)** [γ](#_Toc686599939)**[-](#_Toc686599939)**[氨基丁酸受体](#_Toc686599939) 11

**[1.2.1](#_Toc686599940)** [γ](#_Toc686599940)**[-](#_Toc686599940)**[氨基丁酸受体类型及药理作用](#_Toc686599940) 11

**[1.2.2](#_Toc686599941)****[ARs](#_Toc686599941)**[研究进展](#_Toc686599941) 13

**[1.3](#_Toc686599942)** [阿维菌素类药物研究进展](#_Toc686599942) 15

**[1.3.1](#_Toc686599943)** [阿维菌素毒性研究进展](#_Toc686599943) 15

**[1.3.2](#_Toc686599944)** [阿维菌素组织残留研究进展](#_Toc686599944) 16

**[1.4](#_Toc686599945)** [氟喹诺酮类药物研究进展](#_Toc686599945) 17

**[1.4.1](#_Toc686599946)** [氟喹诺酮类毒性研究进展](#_Toc686599946) 17

**[1.4.2](#_Toc686599947)** [氟喹诺酮类药物残留研究进展](#_Toc686599947) 18

**[1.5](#_Toc686599948)** [本文目的和意义](#_Toc686599948) 18

**[1.6](#_Toc686599949)** [本文主要内容](#_Toc686599949) 18

[第二章 异育银鲫体内](#_Toc686599950)**[GABAA](#_Toc686599950)**[受体及](#_Toc686599950)**[GABA](#_Toc686599950)**[合成代谢酶研究](#_Toc686599950) 19

**[2.1](#_Toc686599951)** [材料与方法](#_Toc686599951) 20

**[2.1.1](#_Toc686599952)** [材料](#_Toc686599952) 20

**[2.1.2](#_Toc686599953)** [方法](#_Toc686599953) 21

**[2.1.3](#_Toc686599954)** [数据处理](#_Toc686599954) 24

**[2.2](#_Toc686599955)** [结果与分析](#_Toc686599955) 24

**[2.2.1](#_Toc686599956)** [引物确证](#_Toc686599956) 24

**[2.2.2](#_Toc686599957)****[AR](#_Toc686599957)**[β](#_Toc686599957)**[2a](#_Toc686599957)**[、](#_Toc686599957)**[AR](#_Toc686599957)**[β](#_Toc686599957)**[2b](#_Toc686599957)**[基因组织分布结果](#_Toc686599957) 25

**[2.2.3](#_Toc686599958)****[AR](#_Toc686599958)**[β](#_Toc686599958)**[2a](#_Toc686599958)**[、](#_Toc686599958)**[AR](#_Toc686599958)**[β](#_Toc686599958)**[2b](#_Toc686599958)**[基因](#_Toc686599958)**[mRNA](#_Toc686599958)**[不同组织表达差异结果](#_Toc686599958) 25

**[2.2.4](#_Toc686599959)****[GABA](#_Toc686599959)**[合成代谢酶基因不同组织表达比较结果](#_Toc686599959) 27

**[2.2.5](#_Toc686599960)** [不同发育阶段](#_Toc686599960)**[AR](#_Toc686599960)**[β](#_Toc686599960)**[2](#_Toc686599960)**[、](#_Toc686599960)**[GAD65](#_Toc686599960)**[、](#_Toc686599960)**[GAD67](#_Toc686599960)**[和](#_Toc686599960)**[GABA-T](#_Toc686599960)**[表达结果](#_Toc686599960) 30

**[2.3](#_Toc686599961)** [讨论](#_Toc686599961) 31

**[2.3.1](#_Toc686599962)** [异育银鲫](#_Toc686599962)**[AR](#_Toc686599962)**[β](#_Toc686599962)**[2a](#_Toc686599962)**[和](#_Toc686599962)**[AR](#_Toc686599962)**[β](#_Toc686599962)**[2b](#_Toc686599962)**[组织特异性表达](#_Toc686599962) 31

**[2.3.2](#_Toc686599963)** [异育银鲫](#_Toc686599963)**[GAD](#_Toc686599963)**[及](#_Toc686599963)**[GABA-T](#_Toc686599963)**[组织特异性表达](#_Toc686599963) 31

**[2.3.3](#_Toc686599964)** [不同发育阶段对](#_Toc686599964)**[GABA](#_Toc686599964)**[受体影响](#_Toc686599964) 31

**[2.4](#_Toc686599965)** [小 结](#_Toc686599965) 31

[第三章 基于](#_Toc686599966)**[GABAA](#_Toc686599966)**[受体的阿维菌素对异育银鲫影响研究](#_Toc686599966) 33

**[3.1](#_Toc686599967)** [材料与方法](#_Toc686599967) 33

**[3.1.1](#_Toc686599968)** [材 料](#_Toc686599968) 33

**[3.1.2](#_Toc686599969)** [方法](#_Toc686599969) 33

**[3.1.3](#_Toc686599970)** [数据处理](#_Toc686599970) 34

**[3.2](#_Toc686599971)** [结果与分析](#_Toc686599971) 34

**[3.2.1](#_Toc686599972)** [阿维菌素急性毒性](#_Toc686599972) 34

**[3.2.2](#_Toc686599973)** [阿维菌素组织残留测定](#_Toc686599973) 36

**[3.2.3](#_Toc686599974)** [阿维菌素对异育银鲫](#_Toc686599974)**[GABAAR mRNA](#_Toc686599974)**[表达影响结果](#_Toc686599974) 40

**[3.2.4](#_Toc686599975)****[AVM](#_Toc686599975)**[对](#_Toc686599975)**[GAD](#_Toc686599975)**[、](#_Toc686599975)**[GABA-T](#_Toc686599975)**[影响研究](#_Toc686599975) 45

**[3.3](#_Toc686599976)** [讨论](#_Toc686599976) 51

**[3.3.1](#_Toc686599977)****[AVM](#_Toc686599977)**[对异育银鲫毒性](#_Toc686599977) 51

**[3.3.2](#_Toc686599978)****[AVM](#_Toc686599978)**[血脑屏障渗透性](#_Toc686599978) 52

**[3.3.3](#_Toc686599979)****[AVM](#_Toc686599979)**[组织残留](#_Toc686599979) 52

**[3.3.4](#_Toc686599980)****[AVM](#_Toc686599980)**[对](#_Toc686599980)**[AR](#_Toc686599980)**[β](#_Toc686599980)**[2](#_Toc686599980)**[亚基影响](#_Toc686599980) 52

**[3.3.5](#_Toc686599981)****[AVM](#_Toc686599981)**[对](#_Toc686599981)**[GABA](#_Toc686599981)**[合成、代谢酶的影响](#_Toc686599981) 52

**[3.4](#_Toc686599982)** [小 结](#_Toc686599982) 53

[第四章 基于](#_Toc686599983)**[GABAA](#_Toc686599983)**[受体的氟喹诺酮类药物对异育银鲫影响研究](#_Toc686599983) 53

**[4.1](#_Toc686599984)** [材料与方法](#_Toc686599984) 54

**[4.1.1](#_Toc686599985)** [材料](#_Toc686599985) 54

**[4.1.2](#_Toc686599986)** [方法](#_Toc686599986) 54

**[4.1.3](#_Toc686599987)** [数据处理](#_Toc686599987) 55

**[4.2](#_Toc686599988)** [结果与分析](#_Toc686599988) 55

**[4.2.1](#_Toc686599989)** [双氟沙星急性毒性试验](#_Toc686599989) 55

**[4.2.2](#_Toc686599990)** [双氟沙星组织残留研究](#_Toc686599990) 57

**[4.2.3](#_Toc686599991)** [双氟沙星对异育银鲫](#_Toc686599991)**[AR](#_Toc686599991)**[β](#_Toc686599991)**[2](#_Toc686599991)**[亚基影响研究](#_Toc686599991) 63

**[4.2.4](#_Toc686599992)****[DIF](#_Toc686599992)**[对异育银鲫](#_Toc686599992)**[GABA](#_Toc686599992)**[合成代谢酶影响结果](#_Toc686599992) 66

**[4.3](#_Toc686599993)** [讨论](#_Toc686599993) 71

**[4.3.1](#_Toc686599994)****[DIF](#_Toc686599994)**[对异育银鲫毒性](#_Toc686599994) 71

**[4.3.2](#_Toc686599995)****[DIF](#_Toc686599995)**[血脑屏障渗透性](#_Toc686599995) 71

**[4.3.3](#_Toc686599996)****[DIF](#_Toc686599996)**[组织消除规律比较](#_Toc686599996) 72

**[4.3.4](#_Toc686599997)****[DIF](#_Toc686599997)**[对异育银鲫的神经毒性研究](#_Toc686599997) 72

**[4.3.5](#_Toc686599998)****[DIF](#_Toc686599998)**[对异育银鲫的心脏毒性研究](#_Toc686599998) 72

**[4.4](#_Toc686599999)** [小结](#_Toc686599999) 72

[1、 本试验条件下，不同剂量的DIF均能引起异育银鲫体内的ARβ2a、ARβ2b基因的表达发生变化，并且推测DIF导致异育银鲫产生神经毒性的机制可能是通过引起ARβ2b表达上调实现的；](#_Toc686600000) 73

[2、 有研究认为FQs可以减少神经末梢GABA的自主释放，但也有研究认为环丙沙星能促进体内GABA含量的增加。而本文认为，DIF用药后会对异育银鲫体内](#_Toc686600001) 73

[3、 本文中在不同剂量及不同时间点均能在异育银鲫大脑中检测到DIF残留，表明](#_Toc686600002) 73

[4、 从大脑、肝脏、肾脏及肌肉四个组织中DIF的消除规律来看，异育银鲫大脑组织可作为DIF药物残留分析的靶组织。](#_Toc686600003) 73

[全文结 论](#_Toc686600004) 73

[创新 点](#_Toc686600005) 74

[参 考 文 献](#_Toc686600006) 75

[附录](#_Toc686600007)**[A](#_Toc686600007)**[缩略词表](#_Toc686600007) 84

[附录](#_Toc686600008)**[B](#_Toc686600008)**[各基因引物目的序列与测序序列比对结果](#_Toc686600008) 87

[附录](#_Toc686600009)**[C](#_Toc686600009)**[各基因荧光定量标准及熔解曲线](#_Toc686600009) 88

[附录](#_Toc686600010)**[D](#_Toc686600010)** [攻读学位期间发表的与学位论文相关的学术文章](#_Toc686600010) 90

III

引 言

γ-氨基丁酸（Gama-Aminobutiric acid, GABA），由于不参与组成蛋白质，因此被称为非蛋白氨基酸。GABA作为中枢神经系统一种重要的抑制性神经递质，中枢神经系统中大约20%-40%突触以其为神经递质。GABA主要通过与GABA受体（GABA receptor, GABAR）作用后，使得GABA受体复合物构型发生了改变，进而使其对离子的通透性发生变化，最终使神经细胞发生超极化，导致抑制性产生。GABAR指的是突触膜上能识别和结合GABA的部位，当GABA与之结合后，细胞膜离子通透性发生改变，从而引起神经抑制。依据GABAR对激动剂和抑制剂的敏感性，可以将其分为GABAAR(ARs)、GABABR（BRs）和GABACR（CRs）三个药理学亚型。其中ARs为离子通道型受体，是由膜蛋白组成的五聚体，形成了GABA识别位点、苯二氮卓类（BDZ）药物识别位点及Cl-通道三个部分。ARs属于半胱氨酸环配体的离子通道家族，由5个亚基组成，ARs每一个亚基拥有一个细胞外N端、4个跨膜结构（M1–M4）域和一个细胞外C端，其中在M3和M4之间形成一个环状结构。每一个五聚体在细胞外N端区域（*α*/*β*亚基连接处表面）形成2个GABA结合位点。在1983年Sigel等首次对ARs提纯并测定了其序列之后，通过cDNA克隆技术目前已鉴定了哺乳动物大脑中的21个ARs亚基。21 个

ARs亚基跟据其氨基酸序列的相似度将其分为如下8个亚基系列：α（1- 6）、（*β* 1–4）、

γ（1-4）、ρ（1-3）、δ、ε、*π*和θ[1, 2]，同一亚基族的不同成员间同源程度为70%～

80%，而各亚基族间氨基酸序列同源程度约为20%～40%[3]。天然ARs主要是由α、

*β*和*γ*亚基组成的，其中α1β2γ2是ARs最主要的一种亚型，大约40%的ARs由α1、

β2和γ2亚基组成，比例为2: 2: 1[4]；而且每一个α1β2γ2亚型中均含有2个α1和β2

亚基[5-8]。

GABA抑制性神经递质传递作用是由GABA受体介导的，GABA通过与不同类型的GABAR结合对机体多种功能发挥特异性调节作用。ARs是中枢神经系统内主要的抑制性受体，参与了中枢神经系统（Central nervous system, CNS）的很多病理及生理过程，但研究并不深入。多种神经和精神疾病例如癫痫、焦虑、脑缺血、疼痛、抑郁、老年痴呆等与ARs功能障碍有关[9]。苯二氮卓类（如氯氮卓、地西泮等）和巴比妥类等药物作用于ARs能发挥其镇静、催眠、抗惊厥等药理作用[10]。同时，ARs还是各种有机氯类以及氟虫腈、阿维菌素类杀虫剂的作用靶标。近年来研究发现，GABA与GABAR还广泛存在于外周组织，参与细胞间的信息传递，与细胞的分化和成熟密切相关。因此，GABAR一直是药物领域的研究热点之一。

1

# 第一章 文献综述

## **1.1** γ**-**氨基丁酸

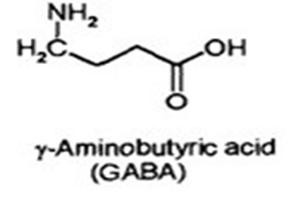
γ-氨基丁酸（GABA），又称氨酪酸，哌啶酸。作为一种化学物质，早在1883

年已被人工合成，后于1950年由Robert等[11]发现存在于哺乳动物神经组织中。由于

GABA不参与组成蛋白质，因此也被称为非蛋白氨基酸。

### **1.1.1** **GABA**理化性质

GABA极易溶于水，分子式为C4H9NO2，相对分子质量为103.12，结构式见图1-1. GABA为两性离子，在pH（4.03～10.56）条件下，其既带正电又带负电荷。另外，GABA在细胞液中有好几种构型，并可形成类似于脯氨酸的环状结构[12]。



### **1.1.2** γ**-**氨基丁酸体内过程

图1-1 GABA结构式

Fig. 1-1 structural formula of GABA

体内GABA主要由饲料（饵料）添加及肠道产GABA菌群的合成后经吸收进入到体内的和机体自身合成的两个来源。有研究显示，肠道菌群的合成是体内产生

GABA的重要来源[13]；而体内GABA的累积主要受GABA支路的影响。

在体内，谷氨酸转化成GABA接着再转化成琥珀酸的代谢途径称为GABA支路

[14]. 支路的第一个步骤就是谷氨酸在谷氨酸脱羧酶（Glutamatedecarboxylase, GAD）

作用下，不可逆的脱去α位上的羧基形成GABA[15]；GABA支路中的第二个酶是

GABA转氨酶（GABA transaminase, GABA-T），GABA-T能够催化GABA生成琥珀酸半醛，在这个反应中α-酮戊二酸作为氨基受体；GABA支路的最后一个反应是琥珀酸半醛被琥珀酸半醛脱氢酶（succinic semialdehyde dehydrogenase, SSADH）

2

不可逆地氧化成琥珀酸（丁二酸），之后琥珀酸再进入三羧酸循环。GABA支路与其他代谢途径之间的关系见图1-2。体内GAD及GABA-T的含量及活性改变会引起体内GABA含量发生变化。在植物体内，不同外界应激条件例如缺氧、机械刺激、热刺激、植物激素等作用后，由于谷氨酸脱羧酶的激活和GABA转氨酶的钝化可促进GABA含量成倍增加[14]。

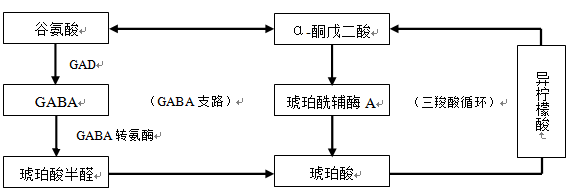


图1-2 GABA支路与三羧酸循环

Fig. 1-2 GABA Branch and Tricarboxylic Acid Cycle

内源性GABA主要在中枢神经系统中合成。在机体内，GABA主要分布在神经组织中，其中哺乳动物在脑组织内的分布最为集中。免疫学实验表明，大脑中黑质和苍白球GABA为浓度最高的区域，下丘脑次之。其中脑组织中的含量大约为0.1-0.6mg/g。有研究表明，各种动物（猫、小鼠、兔和大鼠）肝脏中GABA一般含量为15~100nmol/g，而人肝脏中约为250 nmol/g，人肝含量较高的原因尚不清楚。GABA除了在脊椎动物的中枢神经系统中主要分布之外，还广泛存在于真菌、细菌、藓类、藻类、蕨类和有花植物之中。植物如豆属、参属、中草药等的种子、根茎和组织液中都含有GABA；一般来讲，植物组织中的GABA含量较低，约0.03～2.00μmol/g[16]。

#### **1.1.2.1** **GAD**

GABA是脊椎动物的中枢神经系统主要的抑制性神经递质[17]。GABA的来源可以通过肠道吸收从食物中获取，或者由机体合成。内源性的GABA通过GABA支路合成与代谢。在GABA支路中，GAD催化谷氨酸生成GABA。根据相对分子质量、编码基因以及对辅助因子5-磷酸吡哆醛PLP敏感性的不同，GAD存在GAD65和GAD67两种同工酶。GAD65的相对分子质量为65 000 Da, GAD65在加入辅助因子PLP后，活性升高，是一种脱辅基酶。GAD67的相对分子质量为67 000 Da，GAD67是一种全酶，对PLP无反应。GAD65首次出现在突触发生时，且在轴突末端含量

3

最为丰富。GAD67是成人神经核周体GAD的主要组分，其在胚胎神经上皮细胞中便可检测到，贯穿了神经系统发育的整个过程[18-20]. GAD65 分布于神经突触，而

GAD67存在于树突和神经元胞体上，因此GAD67较GAD65更易于生成GABA[21]。而Nutt等研究发现，近三分之一的GABA是由神经突触分泌的[22]。

除了上述两种常见的同工酶之外，GAD还存在其他形式，例如在神经元内便存在一种GAD异二聚体形式（GAD65-GAD67）。近年来，GAD25是在人胰岛素和其他非神经组织内，例如睾丸当中又新发现一类没有酶活性的GAD形式，这种同工酶是由于GAD67基因在转录后剪切、修饰的部位不同所引起的。它包括一条由

11个氨基酸构成的特异性“尾巴”和另外一段来自GAD67同时不与GAD65完全同源的1-213位氨基酸序列。

#### **1.1.2.2** **GABA-T**

在GABA支路当中GAD催化谷氨酸生成GABA，生成的GABA由GABA-T代谢生成琥珀酸半醛。GABA-T催化将GABA的氨基转移到α-酮戊二酸上，在其转氨基过程中需要磷酸吡哆醛的辅助以生成琥珀酸半醛，磷酸吡哆醛进而转化成磷酸吡哆胺，而α-酮戊二酸在接受氨基生成谷氨酸的过程中又将磷酸吡哆胺还原成磷酸吡哆醛。作为GABA关键代谢酶，其活性高低直接影响到神经递质GABA的水平[23]。研究发现，经抗癫痫药物氨己烯酸（GABA-T抑制剂）治疗后，脑脊液（Cerebrospinal

fluid，CSF）中GABA含量升高[24]

### **1.1.3** **GABA** Th理作用

GABA最早由Roberts和Awapara在1950年从大脑中发现[25, 26]。GABA直到1975年才被确认为哺乳动物中枢神经系统（Central nervous system, CNS）当中的抑制性神经递质[27]。GABA由L-谷氨酸在谷氨酸脱羧酶（GAD）作用下生成的，当GABA受体与其结合后，受体复合物发生构型变化，其离子通透性相应发生改变，最终使得神经细胞产生超极化，进而形成抑制性作用[28, 29]。

神经递质一般是指从神经末梢释放的、可与突触后膜上的受体发生作用并能发挥快速而精确调节的物质。氨基酸类神经递质是中枢神经系统内的主要递质类型，其中谷氨酸（Glu）和天门冬氨酸（Asp）是大脑中重要的兴奋性神经递质，而γ-氨基丁酸（GABA）、甘氨酸（Gly）是大脑中重要的抑制性神经递质，上述递质含量变化伴随着多种中枢神经系统疾病的发生[30]。

GABA是脑组织中一种最为重要的抑制性神经递质，大约50%的中枢突触部位以其为递质[31]。GABA参与神经系统的多种生理功能，对运动、感觉、内分泌、镇痛及生物节律等起着重要调节作用[32]。GABA为三羧酸循环当中“GABA支路”

4

产物，在体内参与能量代谢[33]。一方面，GABA能阻止与焦虑相关的信息抵达脑指示中枢。另一方面，GABA能有效地改善脑血流通，增加氧供给量；同时，GABA能通过恢复脑细胞功能、促进脑组织新陈代谢来改善神经机能；因此GABA能镇静神经，从而产生抗焦虑的作用。GABA是中枢神经系统最重要的抑制性神经递质，在缺血性条件下，它通过与γ-氨基丁酸受体（GABA receptor, GABAR）α1功能亚单位结合后激活GABAAR产生快速抑制作用，降低神经元的兴奋性[34]。Krajnc D 等

[35]研究认为GABA具有突触后抑制作用，可通过突触后膜发生超极化，从而减少

了离子内流和降低了细胞代谢等，使突触后的神经元处在保护性抑制状态，通过突触前抑制减少释放谷氨酸，使得灌注区神经元死亡减少。以前的研究猜测有30%甚至更多的中枢系统神经元以GABA作为神经递质。在抑郁症中，GABA是其中主要的神经递质，通过影响前额叶皮层（PFC）的活动而引起抑郁[36]。另外，公牛精子通过GABA作用于GABAA受体而刺激顶体反应[37]。

γ-氨基丁酸是一种重要的功能性非蛋白质氨基酸，具有增加动物采食量，提高

免疫功能、改善胴体品质、缓解热应激、提高抗缺氧能力和生殖性能等作用[38]。GABA有提高免疫功能、动物生产性能和产品品质等多重效果，因此，在饲料行业中GABA作为一种功能性氨基酸类饲料添加剂已成为研究的热点。在雌性动物中，卵巢与输卵管是机体30多种含有GABA的外周组织中的含量最高的两个器官，其GABA含量超过脑组织中的2倍以上，这预示GABA可能对性腺的生理功能存在调节作用[39]。GABA在抗缺氧方面，GABA能提高海马大脑的抗缺氧能力，其机制可能与GABA引起的Cl-内流有关[40]。魏智清等[41]研究证明质量分数0.3% GABA使鲫鱼在缺氧环境下存活的时间明显延长，说明GABA可以提高鲫鱼的抗缺氧能力。另外，由于GABA还可以与α–酮戊二酸反应生成谷氨酸，抑制了谷氨酸脱氨反应的进行，使得血氨质量浓度有效减少，同时还能促使谷氨酸与氨作用生成谷氨酰胺排出体外，通过解除氨毒增进了肝脏的功能。另外有试验表明金鱼体内中枢GABA能系统对水温变化敏感[42]。

### **1.1.4** **GABA**临床应用

GABA作为一种非蛋白质氨基酸，具有神经抑制作用。在动物体内，GABA具有抗焦虑、抗惊厥及镇痛作用，因而被广泛应用于医药保健品方面用于抗溃疡、抗心率不齐、血糖调节、免疫调节等。另外，GABA对神经系统的发育及胚胎早期外周腺体和器官的分化具有营养作用，可促进蛋白膜、GABAR、一些与神经相关蛋白及酶的合成。同时，GABA还被证实具有提高动物生产性能的作用，因而在动物饲料中添加用于促进动物繁殖、提高动物自身免疫力等[43, 44] 。

5

#### **1.1.4.1** 医药保健品方面

研究表明，GABA具有抗焦虑、抗惊厥，治疗癫痫、哮喘等疾病以及降低血压、调节心律等作用。研究发现，抑制GABA的降解，增加其含量或加强GABA与受体结合，可以防治惊厥；说明GABA具有抗惊厥作用[45]。许多抗焦虑药可通过变构调节GABAA受体、增加GABA合成、抑制GABA的降解、抑制GABA被神经元与神经胶质细胞重摄取等机制强化GABA功能，达到抗焦虑的目的。癫痫发病的重要原因是兴奋性氨基酸与抑制性氨基酸比例失调，GABA介导的抑制性传导异常或缺失是癫痫发作时神经元兴奋性高的主要原因[46]。因而凡是能提高GABAA受体调节功能的药物均能起到明显的抗痫效果[47]。另外，GABA与GABAA受体结合后可阻断哮喘的神经源性炎症，是控制哮喘急性发作的有效药物[48]。降低血压和调节心律方面，GABA与GABAA受体结合可以扩张血管，而与GABAB受体结合可以抑制交感神经末梢，通过这两方面的作用均能达到降低血压的目的[49]。同时研究发现，外源性GABA具有抗心律失常活性，常用于对抗多种实验性心律失常[50]。

#### **1.1.4.2** 提高动物Th产性能方面

大量研究发现，GABA通过增强动物免疫力、增进动物采食、促进动物胃肠活动等提高了动物生产性能。GABA可通过抑制动物的饱食中枢，增强动物采食能力，进而提高畜禽的增重[51]。有研究报道，饲料中添加GABA可显著提高产蛋高峰期母鸡十二指肠至盲肠段中胰蛋白酶总活性，提示GABA可能是通过影响消化酶的分泌来调节动物的小肠功能[52]。增强动物免疫力方面，Abdou等[53]研究表明，GABA对黏膜免疫具有一定增强作用。

#### **1.1.4.3** 抗逆性方面

在脑缺血时，兴奋性氨基酸、自由基等毒性物质含量的增高，GABA作为体内一种主要的抑制性氨基酸，其合成和释放均相应增加。通常认为，抑制性氨基酸可通过多种途径对脑缺血组织起到保护作用。近年来已有试验证据揭示GABA通过其三种受体GABAA、GABAB、GABAC发挥抵抗中枢神经元缺氧或缺血损伤的生理作用[54, 55]。脑缺血缺氧后，针对兴奋性氨基酸（Excitabilitory amino acid, EAA）的毒性作用，机体通过GABA建立了相应的“抑制性保护”机制[56]。据文献报道，缺血期间及缺血后，细胞外抑制性氨基酸GABA和牛磺酸是增加的[57]。张勇等[58]研究发现，血清中的GABA在脑梗死之后呈先升高后降低的双相改变，其中血清

GABA在1天内显著升高，其高峰出现在梗死后的第2天，并在7-10天下降至正常。秦旺华等[59]研究认为龟脑在缺氧条件下，胞外的GABA浓度的持续升高和其受体

6

密度的相应增加而抵抗活性氧基团的生成，可以抑制兴奋性神经递质的毒害作用，进而免受龟脑伤害。抗热应激作用方面，陈忠等[60]研究表明GABA能抑制仔鸡脑干呼吸中枢的整合作用，使得呼吸频率减慢、热性喘息减少，仔鸡的料重比、体重增加，进而提高仔鸡的存活率。

## **1.2** γ**-**氨基丁酸受体

γ-氨基丁酸受体（GABA receptor, GABAR）是指突触膜上能识别和结合GABA的部位，当GABA与其结合后，细胞膜离子通透性发生改变，从而引起神经发生抑制[61]。

### **1.2.1** γ**-**氨基丁酸受体类型及药理作用

根据受体对激动剂和抑制剂的敏感性不同，可以将GABAR分为GABAAR

（ARs）、GABABR（BRs）和GABACR（CRs）三个药理学亚型（见表1-1）。目前昆虫受体暂无此分类，其GABAR主要存在于神经元和肌肉细胞中，是一些杀虫剂的靶标。GABA与不同亚型受体结合，通过特定的信号转导途径，产生不同的调节性作用，进而产生不同受体组合的差异性、药理学性质和内在的受体特性[62]。表1-1 GABAR类型及相关信息

Tab. 1-1 Types of GABAR and its related information

| 受 体 | 类 型 | 典型激动剂 | 典型拮抗剂 | 分布区域 |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| ARs | 离子通道型 | Muscimol CACA | Bicuculline | 突触前膜 |
| BRs | 代谢型 | GABA、3-APPA、3-APMPA等 | Phaclofen、2-OH-saclofen等 | 突出前膜、突触后膜、外周组织  （肺、肾脏等） |
| CRs | 离子通道型 | GABA、TACA等 | 3-APMPA  Picrotoxinin等 | 视网膜、脊髓、  垂体、上丘等 |

#### **1.2.1.1** γ**-**氨基丁酸**A**型受体

ARs为离子通道型受体，是由膜蛋白组成的五聚体，形成了GABA识别位点、苯二氮卓类药物（Benzodiazepines, BDZ）识别位点以及Cl-通道三个部分（图1-3）。

ARs属于半胱氨酸环配体的离子通道家族，由5个亚单位组成，这些膜蛋白控制

GABA门控氯离子通道[63]。ARs每一个亚基拥有一个细胞外N端、4个跨膜结构

（M1–M4）域和一个细胞外C端，其中在M3和M4之间形成一个环状结构。每一个五聚体在细胞外N端区域（α/*β*亚基连接处表面）形成2个GABA结合位点。在1983年Sigel等首次对ARs提纯并测定了其序列之后，通过cDNA克隆技术目前已鉴定了

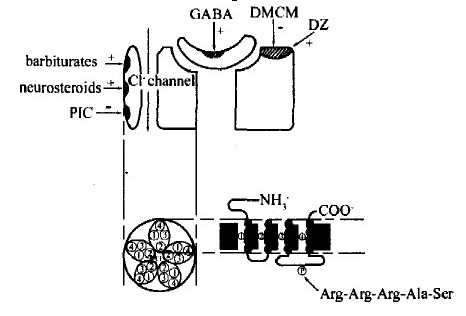
7

哺乳动物大脑中的21个ARs亚基。21个ARs亚基跟据其氨基酸序列的相似度将其分为如下8个亚基系列：α（1- 6）、β（1–4）、γ（1-4）、ρ（1-3）、δ、ε、π和θ[1, 2, 64,

65]，同一亚基族不同成员之间同源程度为70%～80%，而各亚基族间氨基酸序列同

源程度大约为20%～40%[3]。其中γ2又有长型γ2L和短型γ2S两种异构体，从而构成了ARs复合物的多样性以及药理特性的复杂性[66]。哺乳动物大脑中天然ARs主要是由α、β和γ亚基组成的，其中α1β2γ2是ARs最主要的一种亚型，大约40%的ARs由α1、

β2和γ2亚基组成，比例为2: 2: 1[4]；而且每一个α1β2γ2亚型中均含有2个α1和β2亚基



zhi ku quan 20150807

[5-8]。

图1-3 ARs Cl-通道及其亚基的结构类型

Fig. 1-3 Structural model of Cl- channel and subunits of ARs

ARs为五聚体蛋白，这些蛋白形成完整的、通常由GABA控制打开和闭合的、允许Cl-通过的离子通道[67, 68]。氯离子通道通过结合GABA，引起Cl-内流，从而引起细胞膜超极化。ARs为配体门控的氯离子通道，具有巴比妥酸盐、苯二氮卓类、惊厥剂例如木麻醉药、防己苦毒素、神经类固醇、乙醇等配体结合的位点（图1-4）。

8



图1-4 GABAAR示意图

Fig. 1-4 Schematic illustration of GABAAR

GABA识别位点通过增加氯离子通道的开放频率和开放时间来增加氯离子的内流量。由于细胞内的氯离子浓度比细胞外的氯离子浓度低，氯离子顺着浓度梯度差进入细胞内，引起细胞内膜电位增大而发生超极化，介导突触后膜抑制性突

触后电位（Inhibitory post synazphtiickpuotqeuntainal,2I0P1S5P0）8的07发生，这对于谷氨酸等兴奋性氨基酸的“兴奋性毒性”作用具有直接的抑制作用；BDZ类药物识别其结合位点

后，通过变构调节作用增强GABA与识别位点的结合，增加其开启氯离子通道的频率，从而增强GABA的抑制效应。目前，ARs的药理学研究主要集中在BDZ位点上，它的分子机制目前认为是通过结合ARs上一个特异的识别位点（包括*a*1、*a*2、*a*3和*a*5亚基）增强抑制性神经递质GABA的作用[69]。

ARs作为中枢神经系统内主要的抑制性受体，参与了CNS很多病理及生理过程。研究表明，多种神经和精神疾病例如脑缺血、癫痫、焦虑、抑郁、老年痴呆等ARs功能障碍有关[9]。苯二氮卓类（如氯氮卓、地西泮等）和巴比妥类等药物作用于ARs能发挥其镇静、催眠、抗惊厥等药理作用[10]。蝇蕈醇（muscimol）是一种强烈的ARs激动剂，其作用比GABA强l0倍，它可以作用于ARs，使C1-内流增强，引起突触后膜超极化。另一些则报道ARs的阻断剂例如荷包牡丹碱（Bicuculline，

Bic）具有部分的神经保护作用，这说明抑制性递质受体的活动导致了兴奋性毒性

[70]. 有研究报道，大鼠缺血缺氧脑瘫模型中大脑皮质及海马中γ-氨基丁酸A型受体

的α和β亚单位的表达下降，使得GABA作用于ARs所产生的突触后抑制效应降低

[71]. GABA与ARs结合产生中枢抑制作用，GABA可阻断谷氨酸（Glu）的兴奋性

毒性，抑制细胞膜去极化，减少钙离子内流，产生神经保护作用[72]。

9

#### **1.2.1.2** γ**-**氨基丁酸**B**型受体

BRs属于G蛋白偶联受体（G-proteincoulpled receptor, GPCR）中的C家族，是代谢类G蛋白偶联受体。BRs有7个跨膜区，N端位于胞外，C端位于胞内。

BRs分BR1和BR2两种亚基形式，相对分子质量分别为130 000和100 000。它必须由BR1和BR2组成异二聚体才能具有完整功能[73]。

BRs通过G蛋白偶联次级信息传递系统调节Ca2+和K+通道[74]。在突触前膜，

BRs通过降低钙电导而抑制神经递质和神经肽的释放；在突触后膜，BRs通过激发内向型钾电流而使神经元超极化。它广泛存在于神经系统中，并与各类神经和精神错乱疾病有关[75]。BRs对氯苯氨丁酸类敏感，受氯苯氨丁酸及2-羟基氯苯氨丁酸的抑制。BRS激动剂巴氯芬在体内和体外试验中均可通过激活BRs有效抑制肝癌细胞的生长，有望成为一种新型抗肿瘤药物。

#### **1.2.1.3** γ**-**氨基丁酸**C**型受体

CRs是近年发现主要存在于视网膜的一种GABAR. CRs作为一种新型Cl-渗透性离子移变GABAR，也与Cl-通道相偶联，CRs和ARs均属于半胱氨酸环配体门控离子通道（Ligand-gated Ion Channel, LGIC）超家族中的成员[76]。CRs存在单一类

型亚基ρ1-3，由5个ρ亚单位（z含hi一ku个q或ua多n个20ρ11、50ρ820、7ρ3 亚单位）组成的五聚体，每个亚单位组成四个跨膜结构域，中间为一个Cl-通道。CRs最初是在脊椎动物的视

网膜中发被现存在大量分布。而近年来的研究发现，在哺乳动物的小脑、上丘、皮质及海马等中枢神经系统中，也有CRs表达。

与ARs相比，CRs介导持久且不易失活的氯离子内流。顺式-4-氨基巴豆酸

（CACA）是CRs激动剂；1, 2, 5, 6-四氢嘧啶甲基膦酸和3-氨基丙基（甲基）膦酸则是CRs的阻滞剂。

药物作用于CRs主要体现在对视力、昏迷和认知紊乱的治疗上[77]。尽管在过去十年中对GABAR分子属性的认知取得了长足的进展，但至今仍然存在一些令人困惑的问题有待解决，值得注意的是，有学者认为CRs属于ARs家族中的一员，但此说法仍有争议。

### **1.2.2** **ARs**研究进展

大量研究显示，中枢主要的抑制性神经递质γ-氨基丁酸系统在麻醉的产生中起重要作用[78]，并认为ARs复合结构是许多麻醉药物作用的靶部位[79]。

ARs是许多中枢药物作用和调节的重要场所[80]，ARs属于配体门控离子通道超家族，它通过门控跨膜通道的氯离子介导脊椎动物中枢神经系统快速抑制性神经传导[1]，是多种药物例如麻醉剂、镇静剂、抗惊厥药、类固醇类药物、巴比妥类药

10

物的靶部位[81]。研究表明多数全麻药都可增强或模拟GABA的作用[82]。尽管全麻药的作用涉及甘氨酸受体、烟碱受体、GABAR和离子型谷氨酸受体（NMDAR）等，但以GABAR最为重要。以往的研究多限于离体研究，且仅见中枢抑制药（含麻醉药）作用与GABA关系的报道[66, 83, 84]。

#### **1.2.2.1** 在不同物种上的研究

目前，关于ARs在人类、小鼠、大鼠等哺乳动物上有大量的研究。有研究表明，蝇蕈醇（muscimol）作为ARs一种强烈的激动剂，其作用比GABA强l0倍，它可以作用于ARs，使C1-内流增强，引起突触后膜超极化，在大鼠脑室内注射蝇蕈醇0.5 h后再注射马桑内酯，结果无论是脑电图（Electroencephalogram, EEG）还是行为观察发现大鼠癫痫样活动均明显减弱，海马中Fos蛋白表达也明显降低，表明蝇蕈醇对巅痫发作具有强烈抑制作用。

ARs在鸟类（鸽子）上的研究表明，由于AVM能增加GABA从神经末梢释放，使进入细胞内的氯离子增加，使得细胞膜发生超极化，导致神经信号传导受阻，使细胞正常功能丧失，最终出现神经毒性症状；而且随着进入体内AVM量的增加，王鸽抑制性临床症状逐渐加重，同时实验测得3H-muscimol与GABA受体结合量也增大，这一结果表明了AVM 为一种神经毒剂，可以诱导体内神经末梢

GABA大量的释放，促使GABA控制的氯离子通道开放，氯离子内流增大，引起神经细胞膜电位发生超极化，导致神经细胞处于抑制状态，或者直接与特殊感受器作用，阻断了神经冲动，在临床上表现为上述抑制症状。

另外，在两栖类动物上也有大量关于ARs，甚至在鱼类上也有开展ARs研究，但这部分研究主要集中在海水鱼类上，在淡水鱼类特别是大宗淡水鱼类（青鱼、草鱼、鲢鱼、鳙鱼、鲤鱼、鲫鱼、团头鲂等）上还未见相关研究。

#### **1.2.2.2** 药物对**ARs**影响研究

根据受体对激动剂和抑制剂的敏感性不同，可以将GABAR 分为GABAAR

（ARs）、GABABR（BRs）和GABACR（CRs）三个药理学亚型。其中ARs为离子通道型受体，是由膜蛋白组成的五聚体，形成了GABA识别位点、苯二氮卓类药物（BDZ）识别位点及Cl-通道三个部分。

##### （**1**）**ARs**激动剂

GABA是ARs内源性激动剂，当GABA与ARs识别位点结合后，ARs受体复合物构型发生变化，对离子的通透性发生相应改变，最终使得神经细胞超极化，从而产生抑制性作用[28, 29]。另外，蝇覃醇（Muscimol）、异四氢烟酸（Isoguvacine）等ARs 选择性激动剂能诱发GABAA 受体-通道开放。蝇蕈醇是一种强烈的

11

GABAAR激动剂，其作用比GABA强l0倍，它可以作用于GABAAR，使C1-内流增强，引起突触后膜超极化。GABA、蝇覃醇、异四氢烟酸均能引起离子通道开放但开放的平均时间不一样，分别为30.4、76.3和16.3 ms。戊巴比妥和苯巴比妥临床上用于麻醉、镇静、抗惊厥等。在生化研究中，巴比妥类药物通过变构调节从而增加GABAA受体和GABA、苯二氮卓类激动剂的结合。在单通道记录中，巴比妥类药物可以延长GABAA受体-通道的开放时间。

##### （**2**）**ARs**拮抗剂

荷包牡丹碱（bicuculline）为GABA的选择性拮抗剂，是从紫堇科植物中分离的2-苯并[C]呋喃酮异喹啉类生物碱。在单通道记录中，荷包牡丹碱明显缩短

GABAA受体-通道的的平均开放时间，降低其开放频率。GABAA受体竞争性拮抗剂还有生物碱（+）-白毛莨碱和一叶秋碱（Securinine）、GABA哒嗪类等。

苯二氮卓类药物（Benzodiazepines, BZ）多为1, 4-苯并二氮卓的衍生物。常见的衍生物包括地西泮（安定）、氟西泮（氟安定）、氯氮卓、奥沙西泮和三唑仑等。苯二氮卓类药物既包含有ARs的激动剂，又包含有ARs的拮抗剂甚至其反向激动剂。

##### （**3**）其他作用**GABA**受体药物

印防己毒素（Picrotoxin, PIC）由于能阻断由GABAA受体介导的抑制性反应会引起惊厥反应，其作用位点是氯离子通道，为非竞争性作用方式。神经甾体

（Neurosteroid）能增强GABAA受体和蝇覃醇、氟硝安定的结合，包括睾丸酮、黄体酮、皮质酮等甾体类激素的多种代谢产物。

12

## **1.3** 阿维菌素类药物研究进展

1975年日本北里研究所在从静冈县获取的土壤样品中分离得到一株链霉菌*Streptomyaes avermitilis* MA-4680(NRRL8165)。1976年，美国Merck公司从该菌发酵菌丝中提取出了一组由八个结构相近同系物组成混合天然产物，并命名为阿维菌素（Avermectins, AVM），这种混合天然产物具有良好的驱虫活性。

根据取代基不同，AVM可分为A1a、A2a、Bla、B2a、A1b、A2b、B1b、B2b等八个组分，其中四个主要组分为A1a、A2a、Bla、B2a，四个次要组分为A1b、

A2b、B1b、B2b。这八种成分均具有抗虫活性，其中A组分药效较B组分弱，而B1组分药效比B2组分的略强。AVM包括阿维菌素B1a和B1b两种成分，其中B1a的含量不小于80%，B1b的含量不大于20%。其结构式见图1-5。近年来，在天然AVM组分为母体化合物的基础上进行结构改造得到了多种衍生物，例如多拉菌素

（Doramectin, DM）、伊维菌素（Ivermectin, IVM）、埃玛菌素（Emamectin, EM）、埃珀利诺菌素（Eprinomectin, EPM）等。



图1-5 阿维菌素结构式

Fig. 1-5 Structural formula of Avermectins

AVM为一种脂溶性药物，AVM在水中的溶解度极低，仅为0.006～0.009mg/L；可以溶于很多有机溶剂中，如丙酮、甲醇、乙醇、氯仿、环己烷、乙酸乙脂、二甲基亚砜等。在常温、避光、密闭或pH 5～9等环境条件下其性质稳定。另外，

AVM对光敏感，例如用紫外线照射可以导致AVM结构中8～9和10～11之间的双键异构化，进而失去活性。

AVM由于其具有优异的驱虫活性以及较高的安全性，被认为是目前应用最广泛的驱虫药，是近二十年来抗寄生虫药物研究中最为突出的研究成果之一[85]。同时，在水产养殖寄生虫性疾病防治上，AVM因其具有广谱、高效的杀虫特点而广泛使用[86]。

13

### **1.3.1** 阿维菌素毒性研究进展

#### **1.3.1.1** **AVM**动物毒理学研究

作为神经毒剂，AVM主要通过影响GABA释放、改变脑细胞代谢酶活性[87]、诱导脑细胞凋亡[88]等三个方面产生神经毒性。GABA是脊椎动物和无脊椎动物体内重要的抑制性神经递质，其作用是通过产生神经传递抑制，形成突触后膜超极化进而产生抑制动作电位。占领或者破坏GABA受体的作用即能影响动物正常的突触传递，造成神经功能失常，从而引起死亡。基于此开发的杀虫剂主要有阿维菌素类，环戊二烯类等[89]。

##### （**1**）**AVM**对不同物种毒性研究

AVM作为一种神经毒剂，在机体发生急性中毒时，主要体现为神经症状[90]，如震颤、精神抑郁，共济失调，乃至死亡。徐颖等[91]研究发现，大鼠经口灌服阿维菌素后，发生急性中毒临床上可见出现神经毒性症状，重者表现为中枢抑制，出现震颤和特征性毒性症状，而中毒轻者表现为中枢兴奋。Yuri等[92]用大鼠脑片进行体外实验时发现，AVM对哺乳动物具有选择性细胞及神经毒性。体外培养的王鸽脑神经细胞在AVM染毒后也有相似的结果[93]。另外，在阿维菌素LC50（537.03

mg/kg）下，鸽子小脑主要出现水肿、充血和出血等病理变化[94]。

研究表明，AVMs会对有些水生生物产生明显的毒性。周帅等[95]在研究阿维菌素水乳剂、乳油剂型鲢、银鲫、麦穗鱼的急性毒性试验中发现，这三种鱼均表现出神经中毒的症状。徐文彦等[96]在研究阿维菌素急性毒性时发现，黄河鲤中毒初期兴奋，后期精神郁抑，因此推断AVM的毒害作用可能是由于其作用于黄河鲤的中枢神经和外周神经所致。另外，研究表明AVM可以降低雄鱼金鱼生殖腺指数、抑制了精巢GABA-T活性等[97]，说明AVM对鱼类存在生殖毒性。王锡珍等[98]研究认为阿维菌素对水生动物具有较强毒性，其对7种淡水水生动物毒性大小依次为：蚤状溞>银鲫鱼苗>鲢鱼苗>银鲫鱼种>食蚊鱼>幼蟹>青虾>圆田螺。

##### （**2**）不同发育阶段对**AVM**毒性影响研究

在正常AVM使用剂量或者浓度下，由于血-脑屏障作用导致药物在中枢神经系统内含量很低，难以引起GABA释放。但是在超大剂量或者浓度下，AVM进入中枢神经系统的含量可能达到甚至超过作为GABA激动剂的阈值时，从而引起动物中毒。故此，对一些幼畜而言，由于其血-脑屏障还没有发育健全，因而相对于成年动物而言较为敏感。杨卫超等[99]在研究AVM急性经口毒性时发现，不同体重的

Wistar大鼠对阿维菌素LD50有明显影响。朱九生等[100]研究发现，除卵期外，其它

3种发育阶段的赤眼蜂经过阿维菌素处理，羽化后的雌蜂寿命显著缩短。

##### （**3**）药物剂型对**AVM**毒性影响研究

14

张振玲等[101]研究不同阿维菌素制剂对SD大鼠毒性作用时发现，与阿维菌素乳油剂相比较，其微乳剂的毒性相对较小。另外，周帅等[95]认为，阿维菌素水乳剂对鲢鱼、异育银鲫及麦穗鱼的急性毒性比其对应的乳油剂几近减半，结果表明阿维菌素水乳剂剂型降低了其毒性。

#### **1.3.1.2** **AVM** Th态毒理学研究

药物原形或者其代谢产物排出后仍然具有生物效应，因此环境中药物对周围的生态环境、生物的潜在毒性是近年来研究的一个热点[102, 103]。

AVM因具有高效、广谱和使用安全等优点而被广泛应用。随着市场对AVM需求的不断增加，AVM在促进农业以及畜牧发展的同时，也对生态环境产生了负面影响。作为农药，AVM在农业上直接喷洒在各种蔬菜、作物和果树上，喷洒的农药直接或者随大气进入土壤、水体，继而对生态环境造成影响。作为兽药AVM在畜牧业上有多种给药途径，但无论通过何种途径给药，大部分AVM以原型通过粪便排出，其余的通过乳汁或者尿液排出。这些进入环境中的AVM仍然具有生物活性，容易对周围环境造成负面影响。Strong等研究发现，阿维菌素、伊维菌素等在动物粪便中能保持八周左右的活性，并且对草原及堆肥周围的多种昆虫均具有强大的抑制或杀灭作用[104, 105]。环境中的AVM对土壤当中的微生物、蚯蚓及水生生物例如藻类、鱼类等非靶标生物均能造成影响；另外环境中的AVM有可能在生物体内富集，通过生物富集与食物链传递而逐级浓缩。人类处在食物链的顶端，受害程度最为严重[106, 107]。由此AVM的生态毒理学越来越引人关注。

#### **1.3.1.3** **AVM**神经毒理学研究

研究表明，AVMs存在神经毒性[108]、免疫毒性[109]以及生殖毒性[110]等。其中对神经系统的损害最为突出[111]。

在脊椎动物和无脊椎动物神经系统中，有很多这种受体，例如是谷氨酸门控氯离子通道、如γ-氨基丁酸受体A型受体、甘氨酸受体等。谷氨酸门控氯离子通道仅存在无脊椎动物和软体动物体内[112]。现已明确，阿维菌素主要作用于GABA门控的氯离子通道[113]。AVM通过阻碍中枢神经系统中的谷氨酸氯离子通道，使大量的Cl-内流，影响中枢神经递质传递，导致昆虫麻痹最终死亡[114]。而在脊椎动物体内，阿维菌素对γ-氨基丁酸受体A型受体、甘氨酸受体等配体门控氯离子通道同样敏感[115]。GABA是无脊椎动物（如昆虫等）和脊推动物体内的主要抑制性神经递质，AVM作为GABA激动剂作用于GABA受体时，刺激突触前膜GABA大量释放，促进GABA门控氯离子通道开放，大量氯离子进入膜内，形成神经膜电位超极化，产生抑制性突触后电位，导致虫体对兴奋性或抑制性信号传递反应不

15

敏感，进而影响其正常的神经活动，最终导致麻痹死亡[116]。电生理实验和放射配基结合实验均表明阿维菌素类杀虫剂的主要毒理机制为对GABA受体氯离子内流的抑制作用。

早期也有研究认为AVMs作用机理为：在较高浓度（≈5×10mol）时，AVMs作为GABA的激动剂引起突触前GABA释放，进而引起细胞膜对氯离子通道性增加，从而导致由GABA介导的神经-肌肉间及中枢神经系统传导阻滞；但后来发现，

AVMs在较低浓度时（≈2×10mo1）能引起与GABA系统无关的氯离子通道的开放。有研究发现AVM的杀虫机制与抑制性神经递质GABA相关。有研究表明，阿维菌素类药物能促进GABA的释放，增强GABA与GABA受体的结合，从而使氯离子内流增加，导致突触后膜超级化，导致神经信号传导阻滞、细胞功能丧失，进而出现神经毒性症状[117]。而体内GABA主要存在于大脑组织当中。另外研究表明，随着进入体内AVM量的增加，王鸽抑制性临床症状逐渐加重，同时实验测得3H-muscimol与GABA受体结合量也增大，这一结果表明了AVM为一种神经毒剂，可以诱导体内神经末梢GABA大量的释放，促使GABA控制的氯离子通道开放，氯离子内流增大，引起神经细胞膜电位发生超极化，导致神经细胞处于抑制状态，或者直接与特殊感受器作用，阻断了神经冲动，在临床上表现为上述抑制症状。随着AVM进入体内的时间延长，GABAR与3H-muscimol结合量也逐渐增多，导致临床症状愈加明显[118]。大环内酯化合物阿维菌素虽作用于GABAR，有较高的杀虫、杀螨活性，但与ARs拮抗剂作用位点不同，对GABAR具有双向调节作用[119, 120]。伊维菌素通也是通过促进虫体的GABA释放，开放谷氨酸控制的氯离子通道，增强神经膜对氯离子的通透性，阻断神经信号的传递，最终引起虫体死亡。

有研究表明，由于绦虫和吸虫体内缺少GABA神经传导介质，因此AVMs对绦虫和吸虫无效[121]。而绦虫和吸虫体内缺少受谷氨酸门控的氯离子通道被认为是

AVMs类驱虫药对绦虫和吸虫没有效果的另外一个原因[122]。而哺乳动物外周神经传导介质为乙酰胆碱，且以GABA作传导介质的神经仅存在于中枢神经系统；另外，至今尚未发现哺乳动物体内存在受谷氨酸门控的氯离子通道。同时，由于的血-脑屏障作用所导致的AVM 在哺乳动物中枢神经系统的含量很低，难以以引起

GABA释放。因此，AVMs对哺乳动物具有很高的安全性[85]。但在使用超大剂量或者浓度下，AVMs进入中枢神经系统的含量达到甚至超过作为GABA激动剂的阈值时，能引起内源性GABA释放，增强GABA受体与GABA的结合，使得氯离子的内流增加，AVMs并可与受体上的GABA识别位点结合，阻碍神经冲动的产生，即可引起机体中毒。相对于成年动物，由于其血脑屏障尚未发育健全，AVM对一些幼畜因此较为敏感。另外还有研究表明，大环内脂类驱虫药例如阿维菌素、

16

伊维菌素等直接作用于ARs氯离子通道，影响ARs的氯离子电流而发生药效[123]。虽然目前关于AVM与GABA、GABAR的研究不少，但是在水产动物上还鲜有AVM与GABAR相关研究的报道。

### **1.3.2** 阿维菌素组织残留研究进展

药物在预防或治疗动物疾病后，以原形或其代谢产物存在于动物体及其可食产品例如蛋、奶中，称为药物残留。AVM作为脂溶性药物，在动物体内的残效时间较长[124]。另外，按照世界卫生组织（WHO）5级分类标准，AVM为高毒化合物。AVM残留成为兽药残留研究领域重点监控对象之一，其残留检测方法显得极其重要。

#### **1.3.2.1** **AVM**残留检测方法研究

##### （**1**）**AVM**样品前处理

AVM是一类脂溶性很强药物。因此，多种有机溶剂例如甲醇-乙酸乙酯[125（]

70:

30）、甲醇[126]等可以运用在AVM检测样品前处理上。但据报道甲醇沉淀蛋白效果不如乙腈[127, 128]。因此，多数文献报道中样品前处理采用乙腈来提取AVM。陈静等[129]研究认为，采用乙腈作为提取液效果较好，乙腈不但对AVM有很好的溶解性，而且对组织样品渗透力强、沉淀蛋白效果好、回收率较高。

##### （**2**）**AVM**检测方法

阿维菌素类药物由于分子量大的缘故极难气化，因此无法使用气相色谱（Gas

Chromatography，GC）检测。而目前AVM主要采用高效液相色谱（High Performance Liquid Chromatography, HPLC）法进行检测。液相色谱法检测AVM有分下述三种：①液相色谱-紫外检测方法（HPLC-UV）。由于AVM 共轭二烯结构在λ=240-250nm处存在强烈的紫外吸收，因此可以建立液相色谱-紫外检测方法；但因紫外检测器检测具有选择性不高、易受样品杂质的干扰等缺点，因此关于液相色谱-紫外检测方法并不适合AVM 的残留分析。②液相色谱-荧光检测方法

（HPLC-FLD）。对比紫外检测器，荧光检测器更为敏感。一般情况下，荧光检测器比紫外检测器的灵敏度高出100倍，对浓度非常低或样品量很少的痕量分析特别适用。由于AVM没有对称共轭结构，但经荧光衍生化后，生成能发射荧光的对称共轭苯环结构。与HPLC-UV 比较，此方法大大提高了检测限，如在血浆中的

AVM 检测限已达到0.02ng/ml[130]。③液相色谱-质谱检测方法（HPLC-MS）。此方法可以对AVM 残留检测进行确证。Howells和Saner以大气压化学电离-质谱

（APCI/MS）方法测定了AVM的定量限为3.1ng/g[131]。

另外，随着技术的发展，免疫分析方法（例如ELISA、荧光免疫和胶体金技

17

术等）、免疫亲和色谱技术[132]等也被用来进行AVM残留检测。

#### **1.3.2.2** **AVM**在不同动物体内残留

AVM被认为是目前最为优良、应用最广泛的兽用驱虫药。而按照世界卫生组织（WHO）五级分级标准划分，AVM仍属于高毒化合物，在动物组织中的残留时间较长，具有神经及发育毒性。另外，有研究表明，阿维菌素、伊维菌素等在动物粪便中能保持8周左右的活性[104, 105]。另外，AVM因其广谱、高效的杀虫特点而在水产养殖寄生虫性疾病防治上广泛使用。因此有必要对不同动物体内的AVM残留进行检测。目前，关于AVM组织残留或者消除已经在猪[133]、牛[134]、兔[135]等畜禽动物体内开展了大量研究。水产动物上，邢丽红等[136]建立了乙腈提取、碱性氧化铝SPE柱净化，N-甲基咪唑和三氟乙酸酐的乙腈溶液衍化生的高效液相色谱-荧光检测法测定鲈鱼组织中阿维菌素残留的方法。在鳗鱼样品上所建立的阿维菌素残留反高效液相色谱检测方法，其最低检测限达到1μg/kg[137]。秦改晓等[138]在研究阿维菌素在草鱼体内药物代谢动力学后建议对草鱼单剂量（0.3μg/L）阿维菌素药浴后的休药期为24d。

#### **1.3.2.3** 不同组织中**AVM**残留研究

另外，由于药物存在靶向性及组织特异性，药物在同一种动物体内的不同组织中药物残留也不尽相同。Elia 等[139]研究表明，在用药10d 后，土霉素

（Oxytetracycline, OTC）在鲤鱼肝脏、肾脏及肌肉当中均有残留。而关于AVM

组织残留，目前已经在很多畜禽及水产动物的肝脏[134]、肾脏[138]及肌肉[140]等组织中开展了大量研究。但这些药物残留研究多在肌肉、肝脏、肾脏等鱼类可食组织或者与渔药代谢、排泄密切相关器官进行的，而在鱼类脑组织中的渔药残留方面研究不多。目前也尚未有关阿维菌素在鱼类脑组织中残留的报道。

18

## **1.4** 氟喹诺酮类药物研究进展

喹诺酮类（Quinolones）药物是化学合成的一类抗菌药物。自1962年萘啶酸问世以来，此类药物发展非常迅速，开启了合成抗菌药物的新时代。喹诺酮类药物早在80年代初开始用于水产养殖；后来又用于家禽和养猪生产上[17]。

氟喹诺酮类（Fluoroquinolones, FQs）属于第三代喹诺酮类抗菌药，是自1984年诺氟沙星上市以来相继涌现的一大类含氟的喹诺酮类衍生物的总称。FQS是在喹诺酮萘啶环的6位处引入了氟原子，7位上连有哌嗪环，因而又称氟喹诺酮类，是一系列新型氟取代喹诺酮类衍生物。氟喹诺酮类药的作用机制是通过与DNA双链中非配对碱基结而非直接与DNA螺旋酶结合，抑制DNA螺旋酶的A亚单位，使DNA不能形成负超螺旋结构，阻断了DNA复制，进而导致细菌死亡[141, 142]。该类药物抗菌活性显著增强，不良反应较小且其抗菌谱比第一、第二代喹诺酮类药物的抗菌谱明显要广。近年来，FQS因其具有抗菌谱广、抗菌活性强、与其他抗菌药物无交叉耐药性等特点而被广泛使用。

FQs主要品种有环丙沙星、恩诺沙星、双氟沙星、氧氟沙星、沙拉沙星、诺氟沙星、洛美沙星、依诺沙星、甲磺酸达氟沙星、奥比沙星等几十种，其中恩诺沙星、沙拉沙星、甲磺酸达氟沙星、双氟沙星为动物专用药。双氟沙星（Difloxacin，

DIF）是我国农业部2000年批准为国家三类新兽药，DIF属第三代氟喹诺酮类抗菌药物，又名二氟沙星，由美国Abbott公司于1984年首次合成。其化学名称：6-氟-1-对氟苯基-1, 4-二氢-7-（4-甲基-1-哌嗪基）-4-氧代-3-喹啉羧酸。其结构式为：



图1-6 双氟沙星结构式

Fig. 1-6 Structural formula of Difloxacin

DIF因其对大多数革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌、支原体及某些耐药菌株有很好的抗菌活性[143]，是畜禽以及水产养殖上常用的FQS药物之一。

19

### **1.4.1** 氟喹诺酮类毒性研究进展

#### **1.4.1.1** 氟喹诺酮类毒性研究

近年来，随着FQs药物的广泛运用，其毒副作用也逐渐显现，这可能是由于

FQs药物存在结构和性质多样性所致。有研究认为，FQs药物的毒性主要有中枢神经毒性、肝肾毒性、心脏毒性、胃肠道毒性、软骨毒性、生殖毒性等[144]。

中枢神经毒性方面，氟喹诺酮类药物导致的中枢神经系统反应主要表现为头昏、情绪不安、失眠、眩晕等，易诱发癫痫，严重的神经毒性反应可产生幻觉、抑郁等神经疾病反应[145, 146]。据统计，FQs引起神经系统毒性主要表现为精神异常及癫痫[147]。邓艳萍[148]研究发现，在小鼠脑内注射依诺沙星、环丙沙星、氧氟沙星与司巴沙星等5种氟喹诺酮类抗菌药能引起致惊厥作用。有研究认为，几种FQs对CNS的毒性作用大小顺序为：环丙沙星>诺氟沙星>氧氟沙星>培氟沙星>依诺沙星[149]。

肝肾毒性方面，长期高剂量使用FQs可产生明显肝毒性，肝肿胀等，甚至肝细胞坏死；肾脏损害表现为尿素氮和血清肌酐值升高；大剂量可形成蛋白尿、结晶尿、血尿等，严重时可出现水肿、间质性肾炎，甚至继发肾功能衰竭。研究表明诺氟沙星致肝损伤发生率2%～4%，大剂量使用诺氟沙星（1200～1600 mg/d）时可发生结晶尿。

心脏毒性方面，有研究表明，氟喹诺酮类药物诱发尖端扭转性室速（Torsade de Pointes, TdP）概率依次为司帕沙星>格帕沙星>加替沙星>左氧氟沙星>氧氟沙星>环丙沙星[150, 151]。Chiha等[152]运用完全性房室传导阻滞、心室自身心律模型进行心律失常研究表明，司帕沙星较左氧氟沙星致心律失常作用大，并呈剂量依赖性。

#### **1.4.1.2** 双氟沙星毒性研究

作为动物专用FQs之一，FQs毒性例如中枢神经毒性、肝肾毒性、心脏毒性、生殖毒性等双氟沙星理论上同样具备。DIF毒性研究方面。黄文颐等[153]按300、150、

50mg/kg的盐酸双氟沙星给受孕大鼠灌胃时发现高剂量组胎鼠存活率明显降低，显著影响胚胎的生长发育，其严重程度存在量效关系。Burkhardt等[154]研究了二氟沙星大剂量（300mg/kg）用药后，透视观察可见其关节腔内积有泡状囊形物，关节吻合处错位，间距增大，且随着用药时间的增加，关节的损伤程度也在加剧，以肱骨和股骨顶端损伤最为明显。目前关于DIF对鱼类的毒害作用例如中枢神经毒性、肝肾毒性、心脏毒性缺乏深入的研究。

#### **1.4.1.3** 氟喹诺酮类药物神经毒理学研究

研究表明，FQs药物神经毒性与其能竞争性抑制神经递质GABA与GABA受体

20

结合有关。药理研究发现，FQs例如环丙沙星、依诺沙星和诺氟沙星等能够抑制啮齿类动物大脑突触后放射配体与GABAA受体的结合[155]。施杏芬等[156]研究发现，对苯丙氨基苯乙酸（BPAA）能明显增加依诺沙星对3H-蝇覃醇与各受体亚型的竞争抑制作用，IC50减小104～105倍，并推论联苯丁酮酸和BPAA与喹诺酮类药物在体内与GABAA受体相互作用可能是两种药物发生了化学/分子作用，形成了一种与

GABAA受体有着极高亲和力的新结构。

氟喹诺酮类药物可抑制中枢神经介质GABA与受体结合，产生中枢兴奋作用，与非甾体抗炎药（除阿司匹林外）合用，可加剧此种作用，易诱发惊厥，甚至癫痫病发作。FQs 分子中氟原子使其亲脂性增加，其组织渗透能力增强，容易通过

BBB进入脑组织及神经细胞内。FQs在脑脊液中的浓度增高，使得GABA从自主神经末梢释放减少的同时，还可以竞争性抑制GABA与突触后受体结合，使CNS兴奋性增加，导致惊厥和癫痫等不良反应的发生[157]。文献报道，FQs致痫机制是阻止GABA与神经细胞相应的受体结合，而致脑神经细胞的兴奋抑制调节失调[158-160]。邓艳萍[148]研究认为，在氟喹诺酮类药物刺激下，抑制性神经递质GABA释放量减少，GABA与ARs的结合量下降，诱发惊厥。而周义文等研究发现环丙沙星能改变中枢神经系统内兴奋氨基酸及抑制氨基酸的代谢平衡，使抑制性氨基酸GABA含量增大[161]。而目前关于DIF对γ-氨基丁酸受体影响的研究鲜有报道。

### **1.4.2** 氟喹诺酮类药物残留研究进展

随着氟喹诺酮类抗菌药在兽医临床和水产养殖中的应用，其残留问题已引起了广泛的关注[162]。同时鉴于FQs存在的潜在毒性，因此，开展FQs残留检测，对确保食品及环境安全意义重大。

#### **1.4.2.1** **FQs**残留检测方法研究

常见的FQs残留检测方法有微生物法、液相色谱法、高效毛细管电泳分析法、原子吸收光谱法、免疫分析法等。中每种方法各有其特点，适应于不同的目的和要求，其中液相色谱法是最为常用的一种FQs检测方法。

##### （**1**）微生物法

微生物法（Microbiological Assays, MIA）是利用被检样品或提取液中残留的药物对敏感细菌的抑菌圈大小来判断抗菌药物残留情况，本方法样品前处理较为简单，但选择性不高，通常作为筛选方法，目前MIA使较少。黄晓蓉等[163]用*E. coli*

ATCC8739为指示菌检测了鳗鱼及其制品中FQs残留情况。

##### （**2**）色谱分析法

FQs可以运用液相色谱法、高效液相色谱法、液相色谱质谱法等色谱分析法进

21

行药物残留检测。Pena等[164]建立了液相色谱广谱荧光法同时检测恩诺沙星、环丙沙星、诺氟沙星及沙拉沙星的方法。Moema等[165]运用HPLC检测鸡肝脏药物残留时发现恩诺沙星、环丙沙星、诺氟沙星、等在30μg/kg～500μg/k范围内呈线性关系。

##### （**3**）高效毛细管电泳法

高效毛细管电泳法（High Performance Capillary Electrophoresis, HPCE）是新近发展起来的一项技术，具有操作简单、分析速度快、样品用量少等优点，同时它不受运行缓冲液的酸、碱和表面活性剂等影响[166]。沈虎琴等[167]采用高效毛细管电泳法建立了4种FQs与2种四环素类药物同时分离的方法，结果这6种药物在

12min内均能完全分离，且各组分浓度与峰面积呈线性关系。

##### （**4**）其他分析方法

包括原子吸收光谱法、免疫检测法、电导分析和比色法等也常来对FQs及其衍生物的残留检测。

#### **1.4.2.2** **DIF**残留检测研究

近年来随着双氟沙星在兽医临床上的广泛应用，由此引起的动物产品中的药物残留问题也受到日益关注。根据欧盟关于DIF最大残留限量（Mximum Residue Limit, MRL）之规定，DIF在肝脏中的最大残留限量为800μg/kg，在肾脏中的最大残留限量为600μg/kg，在肌肉中最大残留限量为300μg/kg。

DIF残留检测上，上述适用于氟喹诺酮类药物残留检测的方法均适用于DIF的检测。目前，关于DIF药物残留或者消除情况已经在猪[168]、狗[169]、鸡[170]等畜禽动物开展了大量研究。而在水产养殖上，也有关于DIF在中华绒螯蟹[171]、牙鲆[172]、鲫鱼[173, 174]等水产动物体内残留研究的报道。另外，关于FQs例如恩诺沙星[175]

（Enrofloxacin, ENR）、沙拉沙星[176]（Sarafloxacin, SAR）等药物在鱼体内的残留已经开展了大量的研究。另外，欧共体兽药产品委员会（CVMP）研究结果发现，双氟沙星按照正常剂量给药经过12 h后的药物残留低于该组织的最高残留量

（MRL）且残留与畜禽的性别无关。目前现有的关于DIF药物残留研究多在集中在肌肉、肝脏、肾脏等组织或者器官上进行的，而对于DIF是否能渗透通过鱼类血脑屏障进入其大脑组织的研究还未见有相关报道。

## **1.5** 本文目的和意义

阿维菌素类包括阿维菌素、伊维菌素、多拉菌素等。阿维菌素被广泛用于控制家畜体内外寄生物以及农业上的节肢动物害虫，其作用的靶标为配体门控氯离子通道。AVM通过阻碍中枢神经系统中的谷氨酸氯离子通道，使大量的Cl-内流，

22

影响中枢神经递质传递，导致昆虫麻痹最终死亡[114]。另有研究表明，阿维菌素能促进GABA的释放，增强GABA与GABA受体的结合，从而使氯离子内流增加，导致突触后膜超级化，导致神经信号传导阻滞、细胞功能丧失，进而出现神经毒性症状[117]。

另外，有研究认为氟喹诺酮类能竞争性抑制神经递质GABA与GABA受体结合，从而提高神经的兴奋性。FQs分子中氟原子使其亲脂性增加，其组织渗透能力增强，容易通过血脑屏障进入脑组织及神经细胞内。FQs在脑脊液中的浓度增高，使得GABA从自主神经末梢释放减少的同时，还可以竞争性抑制GABA与突触后受体结合，使CNS兴奋性增加，导致惊厥和癫痫等不良反应的发生[157]。文献报道，

FQs致痫机制是阻止GABA与神经细胞相应的受体结合，而致脑神经细胞的兴奋抑制调节失调[158-160]。

众所周知，我国是一个水产养殖大国，同时也是渔药使用大国。目前，渔药仍是最直接、最有效和最经济的水产动物病害控制措施之一。但是，渔药在治愈鱼类疾病的同时，也存在对鱼类的毒性、药物残留等负面问题。另外，渔药对鱼类中枢神经系统的影响及机制不明。异育银鲫为中国科学院水生生物研究所培育的鲫鱼新品种，是我国广泛养殖且经济价值极高的一种淡水鱼类。因此，本论文首先以异育银鲫为研究对象，首先运用反转录PCR（Reverse Transcription PCR, TR-PCR）方法分析了其体内A型GABA受体β2亚基a亚型（AR*β*2a）、A型GABA受体β2亚基b亚型（AR*β*2b）、GAD及GABA-T的组织分布情况，采用实时荧光定量PCR（Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR, qRT-PCR）方法定量研究了异育银鲫体内上述基因在不同组织中的mRNA表达情况；其次选取阿维菌素类中的阿维菌素和氟喹诺酮类药物中的双氟沙星这两种我国水产养殖上最为常用的水产药物，通过研究二者对ARβ2a、ARβ2b、GAD及GABA-T等基因mRNA表达的影响，结合二者对异育银鲫的急性毒性、组织残留特别是二者在脑组织的残留情况，寻求AVM和DIF引起鱼类产生神经症状的原因及可能的机理，从受体的角度为研究渔药对鱼类特别是对鱼类中枢神经系统的影响作初步探索。

## **1.6** 本文主要内容

本论文内容主要分为四个部分。

第一部分为文献综述。主要对GABA、GABAR、阿维菌素类药物包括阿维菌素毒性、氟喹诺酮类药物包括双氟沙星毒性等背景知识作了一个较为系统的介绍。

第二部分主要运用RT-PCR及qPCR技术对异育银鲫体内GABAA受体及与

GABA相关的合成代谢酶进行了组织定性及定量方面的研究，并比较了不同发育阶

23

段异育银鲫体内受体的变化情况。

第三部分为基于GABAA受体的异育银鲫受阿维菌素类药物影响研究。主要对

AVM所引起的受体及酶类变化、AVM在各组织特别是在异育银鲫大脑组织中的残留等方面开展了相应的研究。

第四部分为基于GABAA受体的异育银鲫受氟喹诺酮类药物影响研究。主要开展了DIF对异育银鲫体内受体及酶类影响、以及DIF在各组织特别是在异育银鲫大脑组织中的残留等方面的研究。

24

# 第二章 异育银鲫体内**GABAA**受体及**GABA**合成代谢酶研究

γ-氨基丁酸（GABA）最早由Roberts和Awapara在1950年的时候从大脑中发现。

GABA是脊椎动物的中枢神经系统主要的抑制性神经递质[17]。GABA的来源可以通过肠道吸收从食物中获取，或者由机体合成。内源性的GABA通过GABA支路合成与代谢。在GABA支路中，GAD催化谷氨酸生成GABA，生成的GABA由GABA-T 代谢生成琥珀酸半醛。GAD存在两种同工酶，即GAD65（65kDa）和GAD67

（67kDa）。其中GAD65分布于神经突触，而GAD67存在于树突和神经元胞体上，因此GAD67较GAD65更易于生成GABA [21]。而Nutt等研究发现，近三分之一的GABA是由神经突触分泌的[22]。

在中枢神经系统、外周神经系统及一些非神经组织中，GABA是一种具有多种功效的物质。GABA可以结合、激活A、B、C三种GABA受体[177]。以前的研究猜测有30%甚至更多的中枢系统神经元以GABA作为神经递质。在抑郁症中，GABA是其中主要的神经递质，通过影响前额叶皮层（PFC）的活动而引起抑郁[36]。另外，公牛精子通过GABA作用于GABAA受体而刺激顶体反应[37]。

GABAAR（ARs）是由膜蛋白组成的五聚体，属于半胱氨酸环配体的离子通道家族，由5个亚单位组成，这些膜蛋白控制GABA门控氯离子通道[63]。ARs每一个亚基拥有一个细胞外N端、4个跨膜结构（M1–M4）域和一个细胞外C端，其中在

M3和M4之间形成一个环状结构。每一个五聚体在细胞外N端区域（*α*/*β*亚基连接处表面）形成2个GABA结合位点。ARs已经克隆到19种亚基，这些亚基可以分组为8个亚家族，依次为α（1–6）、β（1–3）、γ（1–3）、δ、ε、θ、*π* 、ρ（1–3）

[64, 65]. ARs为五聚体蛋白，这些蛋白形成完整的、通常由GABA控制打开和闭合的、允许Cl-通过的离子通道[67, 68]。氯离子通道通过结合GABA，引起Cl-内流，从而引起细胞膜超极化。ARs为配体门控的氯离子通道，具有苯二氮卓类、巴比妥酸盐、惊厥剂例如木防己苦毒素、麻醉药、神经类固醇、乙醇甚至一些渔药等配体结合的位点。

异育银鲫是由中国科学院水生生物研究培育的一种广泛养殖的经济鱼类。但是，关于异育银鲫体内ARs、GAD以及GABA-T分布及表达的研究还未见相关报道。另外，α1β2γ2是ARs最主要的一种亚型，而且每一个α1β2γ2亚型中均含有2个α1和β2亚基[5-8]。因此，本文拟以异育银鲫为研究对象，首先运用RT-PC研究ARβ2a和ARβ2b（a、b为GABA受体β2亚基2种亚型）的组织特异性分布情

25

况，然后用荧光定量的方法比较了ARβ2a、ARβ2b、GAD65、GAD67、GABA-T在不同组织中的表达差异。本章的主要目的是研究在异育银鲫体内是否有ARs表达？以及ARβ2a、ARβ2b组织表达的特异性差异如何？其次，本章还比较了不同发育阶段（以体重差异界定不同发育阶段）ARβ2a、ARβ2b表达变化情况；另外，在体内GABA支路中，谷氨酸在GAD的作用下生成GABA，而GABA又在GABA-T催化下代谢为琥珀酸半醛。因此，本章还运用RT-PC及qPCR方法术研究了异育银鲫体内不同组织中GAD65、GAD67和GABA-T分布情况。

## **2.1** 材料与方法

### **2.1.1** 材料

#### **2.1.1.1** 实验动物和取样

体重为60.04±5.02g（商品鱼组）和4.67±0.93g（小鱼组）健康异育银鲫，购自江苏省南通市某农场。暂养2周后开始试验。在暂养及试验期间，水体进行人工曝气（溶解氧：6.5±0.4 mg/L），水温：16±1℃，pH ：7.5±0.3；每天投喂2次。

每次每个规格组随机捞取取6尾鱼，分别取端脑、中脑、小脑、延脑、肝脏、肾脏、心脏、肠道、鳔、鳃、肌肉及鳍条等12种组织，每种组织取约2.0g，-80℃保存用于提取总mRNA。实验用鱼按照中国国家科学与技术委员会实验动物管理条例进行。

#### **2.1.1.2** 主要仪器及耗材

分光光度计（DU800）：Beckmann，US电子天平（BS110S）：瑞士萨托利斯公司超低温冰箱（MDF-U5410）：Sanyo

紫外成像系统：Syngene

电泳仪（DYY-10C）：北京六一电泳槽（DYCP-31DN）：北京六一

漩涡振荡器（QL-901）：海门市其林贝尔无菌操作台（SW-CJ-2F）：苏净集团

低温高速离心机（5417R）：Eppendorf

PCR仪（Mastercycler Gradient）：Eppendorf

荧光定量PCR仪（CFX9）：Bio-Rad

0.2mL薄壁PCR管、1.5mL离心管、各式吸头均为AXYGEN公司产品。

#### **2.1.1.3** 主要试剂

总mRNA提取试剂盒：D9108A，TAKARA

26

反转录试剂盒：DRR036A，TAKARA

普通PCR试剂盒：Hot Start Version, TAKARA D500 DNA Marker: D525A, TAKARA

PCR产物回收试剂盒：Agraose Gel DNApurification Kit Ver.2.0, TAKARA

荧光定量PCR试剂盒：IQ sybr Green Supermix, Bio-Rad

氯仿、异丙醇等购自国药集团。

#### **2.1.1.4** 常用试剂配置

##### （**1**）电泳缓冲液（**50×TAE Buffer** ）

242g Tris碱，57.1ml HAc（乙酸），100ml 0.5M EDTA（乙二胺四乙酸）（pH8.0），定容至1000ml。

##### （**2**）电泳工作液（**l×TAE Buffer**）

50×TAE Buffer稀释50倍即可。

##### （**3**）**DEPC** 水

每1L双蒸水中加入l mL DEPC，终浓度为0.1％，于室温搅拌过夜，高压灭菌，4℃保存；

##### （**4**）去除**RNA**酶的实验用品处理

金属解剖器具和玻璃器皿经180℃烘烤5小时，以灭活RNA酶；塑料离心管、枪头及枪头盒等塑料用品均用DEPC水浸泡过夜后，高压灭菌烘干后使用；琼脂糖凝胶电泳槽、制胶模具用3％的过氧化氢浸泡过夜后，用DEPC水洗净备用。

##### （**5**）**sybrgreen**工作液

原液以ddH2O稀释1000倍即可。

##### （**6**）引物稀释

按照引物合成单说明用DEPC水配成100μM的储存液，再将100μM的储存液稀释成10μM的工作液，-20℃保存。

### **2.1.2** 方法

#### **2.1.2.1** 总**mRNA**提取

（1）取50～100mg组织样品加入1ml trizol（D9108A, TAKALA）匀浆，放置3～5 min，然后向匀浆裂解液中加入氯仿，盖紧，用手剧烈振荡15s；待溶液充

分乳化后室温静置5分钟；

（2）12, 000rpm 4℃离心15 min；

（3）吸取上清液转移至另一新的离心管中；

（4）向上清中加入等体积异丙醇，充分混匀后，在15～30℃静置10 min；

27

（5）12, 000rpm 4℃离心10 min后弃去上清；

（6）沉淀缓慢加入75％乙醇l ml，洗涤，12 000 g 4℃离心5min后弃去乙醇；

（7）RNA溶解：沉淀室温干燥2～5 min，加入适量RNase-free水溶解沉淀，待

RNA沉淀完全溶解后于-80℃保存。

#### **2.1.2.2** 总**mRNA**质量及浓度测定

##### （**1**）**RNA**完整性检测

取2μl RNA样品，加入2μl SYBR染色10 min，之后混入3μl RNA loading

buffer，上样（1%琼脂糖凝胶、0.5×TAE 缓冲液）电泳，凝胶在紫外成像系统

（Syngene）下观察拍照。

##### （**2**）**RNA**纯度检测

取1μl RNA样品，加入99μl RNase-free ddH20，稀释100倍后，DU800分光光度计（Beckmann, US）测定OD260、OD280，其中OD260/OD280比值要求在1.9-2.1之间。

##### （**3**）总**mRNA**浓度测定

终浓度（ng/μL）=（OD260）×（稀释倍数n）×40

#### **2.1.2.3** 反转录

RT-PCR根据反转录试剂盒（D6110A, TAKALA）说明书进行操作。具体如下：取1μL Oligo dT primer (50μM)、1μL dNTP mixture（10 mM）、总RNA样品RNA:1μg（根据所测定的浓度计算需要的体积），最后用RNase free dH2O补充反应体系到10μL。

反转录条件为：30℃反应10 min，42℃反应40 min，95℃反应5 min，反应为

1个循环，RT产物保存在-20℃备用。

#### **2.1.2.4** **PCR**

##### （**1**）**PCR**引物

β-actin、ARβ2a、ARβ2b、GAD65、GAD67和GABA-T基因的RT-PCR和qPCR引物根据GenBank相应保守序列设计（表2-1），其中以β-actin作为内参基因。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

28

表2-1 本研究引物信息

Tab. 2-1 Information of primers used in the study

| 基因  Gene | 引物序列（5′-3′）  Primer sequence | GenBank 号  GenBank ID | 产物大小  Length (bp) | 退火温度  Tm(℃) |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| β-Actin | F: TACGTTGCCATCCAGGCTGTG  R: CATGGGGCAGGGCGTAACC | M24113.1 | 124 | 55–60 |
| ARβ2a | F: CCCGTGTGGCTTTAGGTATCA  R: GACAAAGCAGCCCATCAGGTA | AM904760.1 | 125 | 58.9 |
| ARβ2b | F: CCCGTGTGGCTTTAGGTATCA  R: GACAAAGCAGCCCATCAGGTA | AM904761.1 | 125 | 57.4 |
| GAD65 | F: TTCTCTGTCGCTGCTCTGAT  R: CTCTCGGCTGTAGACCCAT | AF149832.1 | 246 | 57.4 |
| GAD67 | F: GTTTTCTGATATCAAGCGTCTCAC  R: TGGCAGGTTGTCGTAAATTAG | AF149833.1 | 208 | 56.1 |
| GABA-T | F: GCTGCCTGGCCACAACACA  R: TCCCTCACAAACTCCTCCAGA | DQ287923.1 | 115 | 57.5 |

##### （**2**）**PCR** 反应体系

**试 剂** 用量（**μl）**

TAKARA Ex Taq HS 0.25

10×E x Taq Buffer 5

DNTP Mixture 4

上游引物\* 0.5

下游引物\* 0.5

反转录 cDNA 2(50 ng)

RNase free dH2O 37.75

Total 50 μl

其中\*为所对应目的基因上、下游引物。

##### （**3**）**PCR** 反应条件

① 94℃ 2 min

② 94℃ 30 s

③ x℃\* 30 s

④ 72℃ 30 s（②→④ 34 个循环）

⑤ 72℃ 10 min

⑥4℃保存

其中\*为所对应目的基因引物退火温度（见“表2-1”）

##### （**4**）电泳条件

3%琼脂糖凝胶，120 V, 400 A，15 min，其中每5μLcDNA样品加sybrgreen

29

工作液1μL.

#### **2.1.2.5** **PCR**产物回收、**T-A**克隆及测序

##### （**1**）**PCR**产物回收

使用TakaRa Agraose Gel DNApurification Kit Ver.2.0试剂盒（TAKARA）进行凝胶回收，操作过程按照使用说明书，具体步骤如下：

①制备一块1%的琼脂糖凝胶，点样后电泳分离；用干净锋利的刀片将目的

DNA片段的琼脂糖凝胶切下，应尽量切除不含目的DNA部分的凝胶，尽量减少凝胶体积，提供DNA回收率。放入到称重1.5 ml离心管中；切碎胶块，提高回收率。计算胶块体积，以1 g/ml进行计算；

②向胶块中加入胶块融化液DR-ⅠBuffer的加入量（1.0%凝胶，3个凝胶体积的DR-ⅠBuffer）；均匀混合后75℃加热融化胶块，此时应间断振荡混匀，使胶块充分融化（约6～10 min）；

③向上述胶块容易中加入DR-ⅠBuffer量的1/2体积量的DR-ⅡBuffer，均匀混合。当分离小于400 bp的DNA片段时，应在此溶液中加入终浓度为20%的异丙醇；

④将试剂盒中的Spin Column安置于Collection Tube上；

⑤将操作③的溶液转移至Spin Column中，12 000 rpm离心30 s，弃滤液；

⑥将500μl的RinseA加入Spin Column中，12 000 rpm离心30 s，弃滤液；

⑦将700μl的Rinse B加入Spin Column中，12 000 rpm离心30 s，弃滤液，重复一次；

⑧将Spin Column安置于新的1.5 ml的离心管上，在Spin Column膜的中央处加入25μl的灭菌蒸馏水或者Elution Buffer，室温静置1 min；

⑨12 000 rpm离心1 min洗脱DNA。

##### （**2**）**PCR**产物**T-A**克隆及测序

PCR 产物T-A克隆及测序均在上海桑尼生物科技有限公司完成。

#### **2.1.2.6** 荧光定量**PCR**（**qPCR**）

参照荧光定量PCR试剂盒（IQ sybr Green Supermix, Bio-Rad）说明书在荧光定量PCR仪（CFX96, Bio-Rad）上进行。

##### （**1**）**qPCR**反应体系（**20μl**）

|  |  |
| --- | --- |
| **试 剂** | **用量（μl）** |
| IQ sybr Green Supermix | 10 |
| 上游引物 | 0.3 |
| 下游引物 | 0.3 |

30

CDNA \* 2

RNase free dH2O 7.4

Total 20μl

\*为所对应目的基因反转录产物（cDNA）

##### （**2**）**qPCR**反应条件

荧光定量PCR仪（CFX96, Bio-Rad）进行PCR扩增，PCR反应条件95℃2 min；94℃10 s，X℃30 s（40个循环）；然后在60℃～95℃之间制作熔解曲线，参数设定为每个循环上升0.5℃，每个循环5 s，共69个循环。其中X为所对应目的基因引物退火温度。

##### （**3**）标准曲线制作

分别从所有cDNA样品中取等量混合均匀，按10倍依次稀释，依次得到100～10-5不同浓度的标准品样品，然后进行qPCR，通过不同稀释倍数样品的Ct值制作标准曲线。

### **2.1.3** 数据处理

-ΔΔCT

文中数据以平均值±标准差表示。采用2法计算各基因表达变化。运用

SPSS 17.0进行一维方差分析，其中*P* <0.05和*P* <0.01表示差异显著和差异极显著。

## **2.2** 结果与分析

### **2.2.1** 引物确证

#### **2.2.1.1** **RT-PCR**

β-actin、ARβ2a、ARβ2b、GAD65、GAD67和GABA-T基因PCR产物经3%琼脂糖凝胶电泳检测产物大小，长度和预期结果基本相符（图2-1）。而且上述基因

PCR产物经过回收、纯化后，送至上海桑尼生物科技有限公司进行T-A克隆及测序。测序结果经过与GenBank相应序列比对后，确认为目标产物（附录B），表明各引物均为各基因特异性引物（http: //[www. ncbi. nlm. nih. gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)）。

31



图2-1异育银鲫β-actin、ARβ2a、ARβ2b、GAD65、GAD67和GABA-T基因RT-PCR分析。泳道M为Marker(500bp)，1-6泳道分别为β-Actin、ARβ2a、ARβ2b、GAD65、GAD67、GABA-T. Fig.2-1. RT-PCR analyses of the genes in *C. auratus gibelio.* RT-PCR analyses of the genes in *C*. *auratus gibelio*. With Lane M as the marker, Lanes 1–6 are (1)β-Actin, (2) GABAARβ2a, (3) GABAARβ2b, (4) GAD65, (5) GAD67, and (6) GABA-T. The RT-PCR products were tested by agarose-gel electrophoresis.

#### **2.2.1.2** 荧光定量标准及熔解曲线

分别从所有cDNA样品中取等量混合均匀，按10倍依次稀释，依次得到100～10-5不同浓度的标准品样品，然后进行qPCR，通过不同稀释倍数样品的Ct值制作标准曲线。经过试验摸索，发现在退火温度为57.5℃时，β-actin、ARβ2a、ARβ2b、

GAD65、GAD67和GABA-T基因的扩增效率在95%-105%之间，且各自的熔解峰单一（附录C）。说明本文所建立的荧光定量条件正确，另外进一步证明本文所设计的引物特异性强。

### **2.2.2** **AR**β**2a**、**AR**β**2b**基因组织分布结果

#### **2.2.2.1** **AR**β**2a**基因组织分布结果

采用RT-PCR方法，对异育银鲫端脑、中脑、小脑、延脑、肝脏、肾脏、心脏、肠道、鳔、鳃、肌肉及鳍条等12种组织中ARβ2b的表达情况进行了检测。结果显示，在上述12种组织中，均有ARβ2a 和ARβ2b表达（图2-2）。

32



图2-2 异育银鲫不同组织ARβ2a表达分析。泳道M为Marker(500bp)，1-12泳道分别为端脑、中脑、小脑、延脑、肝脏、肾脏、心脏、肠道、鳔、鳃、肌肉及鳍条组织。

Fig.2-2. RT-PCR analyses of ARβ2a in the various tissues of *C. auratus gibelio.* With lane M as marker, lanes 1–12 are (1) telencephalon, (2) mesencephalon, (3) cerebella, (4) medulla oblongata,

(5) Liver, (6) kidney, (7) heart, (8) intestine, (9) swim bladder, (10) gill, (11) muscle, and (12) fin. The RT-PCR products were tested by agarose -gel electrophoresis.

#### **2.2.2.2** **AR**β**2b**基因组织分布结果

采用RT-PCR方法，对异育银鲫端脑、中脑、小脑、延脑、肝脏、肾脏、心脏、肠道、鳔、鳃、肌肉及鳍条等12种组织中ARβ2a的表达情况进行了检测。结果显示，在上述12种组织中，均有ARβ2b表达（图2-3）。



图2-3 异育银鲫不同组织ARβ2b表达分析。泳道M为Marker(500bp)，1-12泳道分别为端脑、中脑、小脑、延脑、肝脏、肾脏、心脏、肠道、鳔、鳃、肌肉及鳍条组织。

Fig.2-3 RT-PCR analyses of ARβ2b in the various tissues of *C. auratus gibelio.* With lane M as marker, lanes 1–12 are (1) telencephalon, (2) mesencephalon, (3) cerebella, (4) medulla oblongata,

(5) Liver, (6) kidney, (7) heart, (8) intestine, (9) swim bladder, (10) gill, (11) muscle, and (12) fin. The RT-PCR products were tested by agarose -gel electrophoresis.

33

### **2.2.3** **AR**β**2a**、**AR**β**2b**基因**mRNA**不同组织表达差异结果

体重为60.04±5.02 g（商品鱼组）的异育银鲫为试验对象，采用qPCR分析端脑、中脑、小脑、延脑、肝脏、肾脏、心脏、肠、鳔、鳃、肌肉及鳍等12种组织中ARβ2a和ARβ2b表达丰度差异。

结果（表2-2）显示，端脑、中脑、小脑、延脑、心脏等5种组织中ARβ2a mRNA的表达量极显著高于肝脏组织中ARβ2a mRNA的表达，其中小脑的含量最高；鳔组织中ARβ2a mRNA表达显著高于肝脏组织；而在肾脏、鳃及鳍组织中，ARβ2a

mRNA的表达极显著低于肝脏组织中ARβ2a mRNA的表达，另外肌肉组织中ARβ2a mRNA含量显著小于肝组织中ARβ2a mRNA的含量。在端脑、中脑、小脑、延脑、心脏等5种组织中，其ARβ2b mRNA的表达量均极显著高于肝脏组织中表达，而肾脏、肠、鳔、鳃、肌肉及鳍等6种组织中ARβ2b mRNA表达正好相反，均极显著低于肝组织中的表达。另外，相对于肝组织中的表达量，在端脑、中脑、小脑、延脑、肾脏、心脏、肠、鳔、鳃、肌肉及鳍条等11 种组织中，鳔组织是

ARβ2a和ARβ2b表达变化唯一不同的组织（鳔组织中ARβ2a的表达显著高于肝组织中的表达，而其中ARβ2b的表达却极显著低于肝组织中的表达）。

总体来讲，脑组织（端脑、中脑、小脑、延脑）中ARβ2a和ARβ2b基因mRNA均高于二者在外周组织（肝脏、肾脏、心脏、肠、鳔、鳃、肌肉及鳍等）的表达。在四种脑组织中，端脑是二者含量均最低的部分；而ARβ2a以小脑表达量最高，

ARβ2b以延脑中的表达量最高（图2-4）。而在肝脏、肾脏、心脏、肠、鳔、鳃、肌肉及鳍等8种外周组织中，ARβ2a和ARβ2b基因mRNA均以心脏组织中的表达量最高（图2-5）。

34

表2-2 异育银鲫不同组织中ARβ2a和ARβ2b相对含量

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 组 织 Tissues | 基 因  Genes | |
| AR*β*2a | AR*β*2b |
| 肝脏 Liver | 0.998±0.002 | 1.000±0.002 |
| 端脑 Tel | 395.071±88.087\*\* | 107.539±10.822 \*\* |
| 中脑 Mes | 602.443±119.578\*\* | 130.826±11.078\*\* |
| 小脑 Cer | 959.243±153.222\*\* | 154.758±14.506\*\* |
| 延脑 Med | 944.828±190.099\*\* | 269.841±18.853\*\* |
| 肾脏 Kidney | 0.286±0.085 △△ | 0.520±0.002△△ |
| 心脏 Heart | 9.139±0.722\*\* | 2.722±0.118 \*\* |
| 肠 Intestine | 1.662±0.327 | 0.264±0.034 △△ |
| 鳔 Swim bladder | 1.749±0.264\* | 0.308±0.012 △△ |
| 鳃 Gill | 0.368±0.038△△ | 0.034±0.002 △△ |
| 肌肉 Muscle | 0.608±0.090 △ | 0.046±0.004 △△ |
| 鳍 Fin | 0.339±0.078 △△ | 0.025±0.004 △△ |

Tab. 2-2 Relative proportions of AR*β*2a and AR*β*2b genes in the different tissues of *C. auratus gibelio*

\*表示含量较肝组织丰富；△表示含量较肝组织低。在同一列中，\* 和△表示与肝组织中含量差异显著，\*\* 和

△△表示与肝组织中含量差极异显著。下同。

\* More abundant than that in liver;△More scarce than that in liver. In the same column, \* and△indicate significantly different from that in liver (*P* <0.05), \*\* and△△indicate most significantly different from that in liver (*P* <0.01). The same as follow.

35



图2-4 异育银鲫脑组织中ARβ2a和ARβ2b相对表达

以端脑为比较，\*和\*\*分别表示显著和极显著高于端脑中的表达（*p* <0.05和*p* <0.01）。Fig.2-4. Relative expressions of ARβ2a and ARβ2b genes in brain of marketable *C. auratus gibelio*.

Relative indices were normalized by the relative expression in telencephalon respectively.

\* indicates significantly different from that in telencephalon (*p* <0.05), and \*\* indicates most significantly different from that in telencephalon (*p* <0.01).



图2-5 异育银鲫外周组织中ARβ2a和ARβ2b相对表达

以鳃组织为比较，\*和\*\*分别表示显著和极显著高于鳃组织中的表达（*P* <0.05和*P* <0.01）。Fig.2-5 Relative expressions of ARβ2a and ARβ2b in the peripheral tissues of marketable *C. auratus gibelio*. Relative indices were normalized by the relative expression in gill respectively. \* indicates that significantly different from that in gill (*P* <0.05), and \*\* indicates that most significantly different from that in gill (*P* <0.01).

### **2.2.4** **GABA**合成代谢酶基因不同组织表达比较结果

#### **2.2.4.1** **GABA**合成酶基因表达结果

采用qPCR检测了端脑、中脑、小脑、延脑、肝脏、肾脏、心脏、肠、鳔、鳃、肌肉及鳍等12种组织GAD65和GAD67 mRNA的表达差异情况。结果显示（表2-3）：

36

GAD65和GAD67主要在脑组织（端脑、中脑、小脑、延脑）中合成。另外，在外周组织中也有表达，但是鳔和鳍组织中的GAD65 mRNA的表达量极显著和显著高于肝组织中的表达量，而且肾组织中GAD65 mRNA的表达均最低；而GAD67 mRNA外周组织表达以肝脏中最为丰富，肾脏、心脏、肠、鳃和肌肉组织中GAD67 mRNA的表达均显著或者极显著低于肝组织中的表达量，其中以肾组织及心脏中的表达最低。

另外一个有趣的结果就是，在四种脑组织中，除了延脑中GAD65 mRNA表达低于GAD67 mRNA的表达外（0.91±0.22），其余三个部分（端脑、中脑、小脑）均以GAD65 mRNA的表达量丰富（均在2倍左右）（表2-4）。

表2-3 异育银鲫不同组织中GAD65和GAD67相对表达量

Tab. 2-3 Relative proportions of GAD65 and GAD67 genes in the different tissues of C. auratus gibelio

| 组 织 Tissues | 谷氨酸脱羧酶  GAD | |
| --- | --- | --- |
| GAD65 | GAD67 |
| 肝脏 Liver | 1.00±0.00 1 | 1.00±0.002 |
| 端脑 Tel | 281.34±25.00\*\* | 238.59±29.96\*\* |
| 中脑 Mes | 557.26±44.05\*\* | 509.44±54.17\*\* |
| 小脑 Cer | 120.80±16.03\*\* | 111.59±18.27\*\* |
| 延脑 Med | 351.96±28.93\*\* | 701.60±91.68\*\* |
| 肾脏 Kidney | 0.13±0.05△△ | 0.09±0.03 △△ |
| 心脏 Heart | 1.03±0.34 | 0.09±0.03△△ |
| 肠 Intestine | 1.46±0.16 | 0.15±0.04△△ |
| 鳔 Swim bladder | 4.12±0.62\*\* | 0.42±0.08 |
| 鳃 Gill | 1.05±0.14 | 0.16±0.06 △△ |
| 肌肉 Muscle | 1.40±0.24 | 0.27±0.07△ |
| 鳍 Fin | 2.69±0.36\* | 0.35±0.09 |

37

表2-4 异育银鲫不同脑组织中GAD65和GAD67 mRNA表达比较

Tab. 2-4 Comparison of mRNA Expression of GAD65and GAD67 in brain of *C. auratus gibelio*

| 组织  Tissues | 端脑  Telencephalon | 中脑  Mesencephalon | 小脑  Cerebella | 延脑  Medulla oblongata |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| GAD65/GAD67 | 2.12±0.38 | 2.04±0.33 | 2.01±0.23 | 0.91±0.22 |

#### **2.2.4.2** **GABA**代谢酶（**GABA-T**）基因表达结果

GABA-T是体内GABA支路中的另外一种重要的酶类。端脑、中脑、小脑、延脑、肝脏、肾脏、心脏、肠、鳔、鳃、肌肉及鳍等12种组织GABA-T mRNA荧光定量结果（表2-5）显示，虽然端脑、中脑、小脑、延脑等脑组织是其主要合成部位，但最为外周组织的肝脏，确是包含中枢及外周组织在内的12种组织中GABA-T mRNA表达最为丰富的部位，表明肝脏是异育银鲫体内GABA主要代谢部位。

表2-5 异育银鲫不同组织中GABA-T相对表达量

Tab. 2-5 Relative proportions of GABA-T expressed in different tissues of*C. auratus gibelio*

| 组 织  Tissues | GABA 转氨酶  GABA-T |
| --- | --- |
| 肾脏 Kidney | 1.00±0.00 2 |
| 端脑 Tel | 4.44±0.65\*\* |
| 中脑 Mes | 10.08±0.98\*\* |
| 小脑 Cer | 4.41±0.31\*\* |
| 延脑 Med | 7.11±0.66\*\* |
| 肝脏 Liver | 11.05±1.15\*\* |
| 心脏 Heart | 0.75±0.10△ |
| 肠 Intestine | 1.03±0.28 |
| 鳔 Swim bladder | 0.13±0.02△△ |
| 鳃 Gill | 0.24±0.07△△ |
| 肌肉 Muscle | 0.41±0.06△△ |
| 鳍 Fin | 0.73±0.09△△ |

38

\*表示表达较肾组织中的丰富；△表示表达较肾组织中的低。在同一列中，\*和△表示与肾组织中的表达差异显著，\*\* 和△△表示与肾组织中的表达差极异显著。

\* More abundant than that in kidney;△More scarce than that in kidney. In the same column, \* and△indicate significantly different from that in kidney (*P* <0.05), \*\* and△△indicate most significantly different from that in kidney (*P* <0.01).

### **2.2.5** 不同发育阶段**AR**β**2**、**GAD65**、**GAD67**和**GABA-T**表达结果

有研究认为，体内GABAAR的数量可能随着发育阶段的不同而存在差异。因此，本研究以体重差异作为不同发育阶段的比较指标，以60.04±5.02 g（商品鱼组）和4.67±0.93 g（小鱼组）异育银鲫为研究对象，运用qPCR方法测定了端脑、中脑、小脑、延脑、肝脏、肾脏、心脏、肠、鳔、鳃、肌肉及鳍等12种组织中ARβ2a和ARβ2b表达变化，以研究异育银鲫发育过程中GABAAR变化情况；同时对不同发育阶段异育银鲫各组织中GAD65、GAD67和GABA-T的表达变化进行了比较。

#### **2.2.5.1** 不同发育阶段**AR**β**2a**和**AR**β**2b**表达变化结果

两个不同发育阶段（以体重表示不同发育阶段）异育银鲫的端脑、中脑、小脑、延脑、肝脏、肾脏、心脏、肠、鳔、鳃、肌肉及鳍等12种组织中ARβ2a 和

ARβ2b表达变化结果显示：随着体重的增加，端脑、中脑、小脑、延脑、肝脏、肾脏、心脏、肠道等8种组织中ARβ2a和ARβ2b基因mRNA表达均上调，其中

ARβ2a基因以肝组织上调最为显著，而ARβ2b基因以心脏中的上调最为明显；而在鳃、肌肉和鳍等三种组织中，ARβ2a和ARβ2b基因mRNA表达均下调，且均以肌肉组织下调最大；另外，虽然体重发生了改变，但是鳔组织中ARβ2a和ARβ2b基因mRNA的表达却基本保持不变（图2-6）。



图2-6 商品鱼组与小鱼组异育银鲫不同组织ARβ2a和ARβ2b表达比较

39

比值＞1预示表达上调，比值＜1预示表达下调

Fig. 2-6 Comparison of ARβ2a and Rβ2b mRNA expression between marketable group and fingerling group in different tissues of *C. auratus gibelio.* A ratio greater than 1 signifies

Up-regulated expression in marketable group, whereas a ratio less than 1 signifies down-regulated expression.

#### **2.2.5.2** 不同发育阶段**GAD65**、**GAD67**和**GABA-T**表达变化结果

##### （**1**）不同发育阶段**GAD65**和**GAD67**表达变化结果

两个不同发育阶段（商品鱼组和小鱼组）异育银鲫的不同组织中GAD65 和

GAD67表达变化结果（图2-7）显示：相对于小鱼组对应组织，商品鱼组异育银鲫中脑、小脑、延脑、肝脏、鳔、鳃、肌肉及鳍等8个组织中GAD65 mRNA表达均上调，其中肝脏、鳔、及肌肉组织上调较为明显，分别上调7.23±0.62、6.58±0.54 、

7.20±0.51倍；表达下调的组织包含端脑、肾脏、心脏及肠等四种组织，以肾脏下调最为明显（下调至小鱼组的0.20±0.04倍）。而GAD67 mRNA相对于小鱼组对应组织表达上调的组织有端脑、中脑、延脑、肝脏、心脏、鳔、鳃、肌肉及鳍等 9

个组织，其中以肝脏和鳔组织上调明显，分别上调13.61±1.99倍和12.80±1.53倍；小脑、肾脏及肠等3个组织中GAD67 mRNA表达下调，其中肾组织下调最大，为0.81±0.17倍。

总体看来，肝脏和鳔两个组织中GAD65和GAD67基因mRNA均明显上调，而肾脏组织是二者均表达下调最大的组织。



图2-7 商品鱼组与小鱼组异育银鲫不同组织GAD65和GAD67表达比较比值＞1预示表达上调，比值＜1预示表达下调

Fig.2-7 The comparisons of GADs mRNA expressions in different tissues between marketable fish and fingerlings of *Carassius aumtus.* Ratio greater than 1 means up-regulated and ratio less than 1 means down-regulated.

40

##### （**2**）不同发育阶段**GABA-T**表达变化结果

两个不同发育阶段（商品鱼组和小鱼组）异育银鲫的不同组织中GABA-T表达变化结果（图2-8）显示：相对于小鱼组对应组织，商品鱼组异育银鲫鳃和鳍两个组织中GABA-T mRNA表达下调，而端脑、中脑、小脑、延脑、肝脏、肾脏、心脏、肠、鳔及肌肉等10种组织均上调表达，其中以肝脏和肌肉两个组织上调最为

明显，分别上调9.03±0.87倍和5.34±0.4 7倍。



图2-8 商品鱼组与小鱼组异育银鲫不同组织GABA-T表达比较比值＞1预示表达上调，比值＜1预示表达下调

Fig.2-8 The comparisons of GABA-T mRNA expressions in different tissues between marketable fish and fingerlings of *Carassius aumtus.* Ratio greater than 1 means up-regulated and ratio less than 1 means down-regulated.

## **2.3** 讨论

### **2.3.1** 异育银鲫**AR**β**2a**和**AR**β**2b**组织特异性表达

ARs 是GABA 能系统中研究最为广泛的一类受体，同时也是广泛分布的

GABAR受体亚型，负责中枢神经系统中多种重要的行为[178, 179]。通过寡核苷酸探针进行原位杂交组织化学技术发现，在大鼠中枢神经系统中的神经元上有ARsγ2亚基mRNA分布[180]。以35s标记反义寡核苷酸探针进行的原位杂交显示，在雌鼠视上核和室旁核中的所有视觉神经上的ARs编码γ2亚基而不是γ1或者γ3亚基mRNA [181]。另外，原位杂交组织化学还发现，在大鼠脑组织中有编码ARsα3和α4亚基的mRNA表达[182]。另外，从小鸡的大脑中分离得到了编码γ4亚基的AR的cDNA [183]。还有，鸟类的大脑也被发现有ARs和BRs的基因表达[184]。目前，在爬行动物，例如龟类也开展了GABAR研究[185, 186]。GABA和GABA类似物的结合显示在大西洋鲑鱼大脑中存在高亲和性ARs和ARs/苯二氮类受体[187]。另外，

41

在两栖动物例如牛蛙上也发现有ARs存在[188, 189]，3H标记的蝇蕈醇结合位点的结合特性及配体特异性是这种两栖动物含有GABAA 样受体假设的有力支持，这类

GABAA样受体具有哺乳动物ARs相类似的特性。作为哺乳动物BRs激动剂的巴氯芬，不能抑制3H标记的蝇蕈醇结合，说明在牛蛙上，3H标记的蝇蕈醇结合是受

GABAA样受体，而不是GABAB样受体调控[189]。另外，在蟑螂上被发现存在一类新的ARs [190]。而克隆的具有与相应的脊椎动物药理学差异的GABAR说明在果蝇具有特定的受体亚基[191]。甲壳类动物，如小龙虾，也被证实具有ARs [192, 193]。另外，在脑外组织中也进行过ARs的研究。GABAR广泛存在于包括部分的

周围神经系统、内分泌系统以及非神经组织（例如平滑肌和女性生殖系统）的外围组织中[194]。在体外试验中，从大鼠胃组织中证实存在GABAR的多种亚型[195]。在外周血液单核细胞[196]、血液白细胞[197]及T细胞[198, 199]上发现有ARs亚基存在。采用RT-PCR技术，在大鼠包括肾上腺、卵巢、睾丸、胎盘、子宫、小肠等在内的外围组织中发现有ARs亚基的广泛表达。另外，在大鼠胃黏膜上也发现有ARs[200]。在胰腺上也观察到有不同的ARs亚基表达[201, 202]。

基于在哺乳动物、鸟类、爬行类、两栖类、甲壳类甚至海水鱼类等物种上发现有ARs，因此可以假设在异育银鲫上也有ARs存在。ARβ2a和ARβ2b是ARs两种主要的亚基。本研究中，运用RT-PCR 方法，首先证实了在异育银鲫体内有

ARβ2a 和ARβ2b的存在（图2-1）；同时进一步研究发现，不仅在其中枢神经系统

（端脑、中脑、小脑、延脑），而且在其外周组织（肝脏、肾脏、心脏、肠道、鳔、鳃、肌肉、鳍条等）也发现有ARβ2a 和ARβ2b的表达（图2-2, 图2-3）。

在大鼠的肾上腺、卵巢、睾丸、小肠等多种内分泌组织上，发现ARs亚基的具有组织特异性表达[203]。目前，荧光定量PCR技术由于其具有高通量、灵敏度、准确性等有点已经成为基因表达分析的一个强有力的工具，因此，本研究采用荧光定量PCR技术分析异育银鲫体内ARβ2a和ARβ2b表达的组织特异性。结果显示，在商品鱼组异育银鲫的不同组织中，ARβ2a和ARβ2b的分布广泛且不均一。总体来讲，脑组织（端脑、中脑、小脑、延脑）中ARβ2a和ARβ2b基因mRNA均高于二者在外周组织（肝脏、肾脏、心脏、肠、鳔、鳃、肌肉及鳍等）的表达。在四种脑组织中，端脑是二者含量均最低的部分；而ARβ2a以小脑表达量最高，

ARβ2b以延脑中的表达量最高（图2-4）。而在肝脏、肾脏、心脏、肠、鳔、鳃、肌肉及鳍等8种外周组织中，ARβ2a和ARβ2b基因mRNA均以心脏组织中的表达量最高（图2-5）。

42

### **2.3.2** 异育银鲫**GAD**及**GABA-T**组织特异性表达

GABA由Robert等于1950年[11]发现，被认为是哺乳动物、甲壳类动物、昆虫和某些寄生蠕虫神经系统中重要的抑制性神经递质。在中枢神经系统、周围神经系统和一些非神经组织中，GABA是一个多功能的分子。运用免疫组织化学和尼氏染色研究发现，在成年斑马鱼的大脑中有包含GABA的神经元分布[204]。GABA通过与其离子型受体（ARs和CRs）或者与其代谢性受体（BRs）结合而发挥作用。除了在神经发育过程中的作用外，GABA还参与大脑之外的多种组织和器官中的各种生理功能。此外，GABA在自主神经系统起到神经递质或神经调节物质的作用，在非神经周围组织中又成为其中的激素或营养因子[194, 205]。经过GABA处理后，人胚胎肾细胞（HEK 293）表面ARs表达增加[21]。在细胞胰岛、输卵管、肠道肌间神经丛等细胞中，GABA的含量和在中枢神经系统中的基本相当[206]。在体内，GABA通过GABA支路生成和代谢，其中包含GAD、GABA-T两种与GABA生成、代谢密切相关的酶。因此，开展体内GABA生成及代谢酶的研究对于分析体内GABA含量变化具有重要意义。

#### **2.3.2.1** 异育银鲫**GAD**组织特异性表达

GAD存在GAD65和GAD67两种异构体，其中前者在神经末端含量丰富，而后者在神经元胞体和树突含量较高。本研究中，运用RT-PCR方法首先证实了在异育银鲫体内有GAD65和GAD67的存在（图2-1）；然后采用qPCR检测了异育银鲫不同组织中GAD65和GAD67 mRNA的表达差异情况。结果（表2-3）显示：GAD65和GAD67主要在脑组织（端脑、中脑、小脑、延脑）中合成。高浓度的GABA出现在突触末端，而在大脑细胞之间的空隙中，GABA的含量为0μM～1μM [207-209]。这可能就是异育银鲫大脑组织中GAD65和GAD67基因mRNA表达水平较外周组织中高的原因。

另外，在四种脑组织中，除了延脑中GAD65 mRNA表达低于GAD67 mRNA的表达外（0.91±0.22 倍），另外三个部分（端脑、中脑、小脑）均以GAD65 mRNA的表达量丰富（均在2倍左右）（表2-4）。结果预示，异育银鲫大脑中内源性GABA主要有GAD65催化谷氨酸而来。

#### **2.3.2.2** 异育银鲫**GABA-T**组织特异性表达

GABA-T是体内GABA支路当中的另外一种重要的酶类。本研究首先运用RT-PCR 方法证实了在异育银鲫体内有GABA-T的存在（图2-1）。其次采用荧光定量PCR技术分析了端脑、中脑、小脑、延脑、肝脏、肾脏、心脏、肠、鳔、鳃、肌肉及鳍等12种组织GABA-T mRNA表达的差异。结果显示（表2-5），虽然端

43

脑、中脑、小脑、延脑等脑组织是其主要合成部位，但作为外周组织的肝脏，确是包含中枢及外周组织在内的12种组织中GABA-T mRNA表达最为丰富的部位，结果表明肝脏组织是机体内GABA主要代谢部位。

### **2.3.3** 不同发育阶段对**GABA**受体影响

研究表明，ARs基因的表达可能受到机体的年龄，所处的病理状态、压力、环境温度等因素的影响[42]。偏头痛患者的外周血液白细胞中GABRA3（GABAA受体的亚单位）和GABAB2（GABAB受体的亚单位）均显著下降[197]。当情绪失调的时候，人侧前扣带回（ACC）中的ARβ2转录水平显著下降[210]。震颤大鼠的海马中GABAAR中α1亚基的mRNA和蛋白的表达均显著上调[211]。急性约束应激明显降低了大鼠海马和前额叶皮质GABAA受体α1亚基的表达水平[212]。有些报道认为经急性或反复施压后，在大脑特定区域内ARs亚基的会发生变化[213-216]。此外，利用定量斑点印迹和原位杂交技术研究发现，小脑和大脑皮层中ARs的多种亚基（*α*1、*γ*2、*β*2、*β*3、*δ*）的mRNA表达具有与年龄相关联显著下调的特性[217]。在Sprague-Dawley and Fischer 344大鼠大脑的一些区域，ARs的γ2s和γ2L亚基mRNA的表达发现存在与年龄相关的变化[218]。在发育中鸡的大脑中，γ4亚基在13日龄的时候首次被检测到，其转录水平在整个胚胎发育期间逐步增加[183]。而周小毛等[219]在研究不同发育阶段

GABAA受体基因表达的差异时发现，处于不同发育时期小菜蛾体内的GABAA受体表达量差异不大。已知的纹状体神经元中ARs随时间的表达过程与正常发育纹状体的形态学成熟、突触活动的功能健全等非常吻合[220]。

本论文也开展了不同发育阶段即年龄对ARβ2a和ARβ2b表达变化影响的研究。结果显示：随着体重的增加，端脑、中脑、小脑、延脑、肝脏、肾脏、心脏、肠道等8种组织中ARβ2a和ARβ2b基因mRNA表达均上调，而在鳃、肌肉和鳍等3种组织中，ARβ2a和ARβ2b基因mRNA表达均下调，且均以肌肉组织下调最大。另外，虽然体重发生了改变，但是鳔组织中ARβ2a和ARβ2b基因mRNA的表达却基本保持不变（图2-6）。结果表明，同一组织的不同发育阶段，ARβ2a和ARβ2b两个亚基mRNA的表达是可能会发生变化的。而引起不同发育阶段的不同组织中ARβ2a和ARβ2b变化不一致的原因还有待于进一步的研究。

## **2.4** 小 结

1、RT-PCR试验结果显示在异育银鲫中枢神经系统（端脑、中脑、小脑、延脑）和外周神经组织（肝脏、肾脏、心脏、肠道、鳔、鳃、肌肉及鳍条）均有ARβ2a和ARβ2b mRNA表达；qPCR实验结果表明ARβ2a和ARβ2b mRNA主要在中枢神经系

44

统内分布。

2、GAD65、GAD67和GABA-T同样被发现在异育银鲫中枢神经系统（端脑、中脑、小脑、延脑）和外周神经组织（肝脏、肾脏、心脏、肠道、鳔、鳃、肌肉及鳍条）均有ARβ2a和ARβ2b mRNA表达，且其主要分布也是集中在中枢神经系统内。

**本章内容为描述性研究，为进一步研究异育银鲫体内GABAAR其他亚型，为探索GABAAR潜在药理学性质，以及为从GABAAR角度探究渔药对鱼类（异育银鲫）的影响等方面作了初探。**

45

# 第三章 基于**GABAA**受体的阿维菌素对异育银鲫影响研究

阿维菌素（Avermectin, AVM）是阿维链霉菌素通过自然发酵得到的产物，包括阿维菌素B1a和B1b两种成分，由于其具有优良的广谱抗寄生虫作用而被广泛应用。而AVM被认为是一种神经毒剂，在机体发生急性中毒时，主要出现中枢和外周神经症状[90]。徐颖等[91]研究发现，大鼠经口灌服阿维菌素后，发生急性中毒临床上可见出现神经毒性症状，重者表现为中枢抑制，出现震颤和特征性毒性症状，而中毒轻者表现为中枢兴奋。体外培养的王鸽脑神经细胞在AVM染毒后也有相似的结果[93]。Yuri等[92]用大鼠脑片进行体外实验时发现，AVM对哺乳动物具有选择性细胞及神经毒性。另外，在阿维菌素LC50（537.03 mg/kg）下，鸽子小脑主要出现水肿、充血和出血等病理变化[94]]。周帅等[95]在研究阿维菌素水乳剂、乳油剂型鲢、银鲫、麦穗鱼的急性毒性试验中发现，这三种鱼均表现出神经中毒的症状。徐文彦等[96]在研究阿维菌素急性毒性时发现，黄河鲤中毒初期兴奋，后期精神郁抑，因此推断AVM的毒害作用可能是由于其作用于黄河鲤的中枢神经和外周神经所致。另外，研究表明AVM可以降低雄鱼金鱼生殖腺指数、抑制了精巢GABA-T活性等，表明AVM对鱼类具有潜在的生殖毒性[97]。

有研究表明，阿维菌素对植物没有毒性，对哺乳动物毒性较低，对鱼类和虾蟹类毒性较强[221, 222]。而AVM是水产养殖上最为常用的寄生虫性疾病防治药物之一。另外，有研究表明，AVM的作用机制与抑制性神经递质γ-氨基丁酸相关[117]。早期的研究认为AVMs作用机理为：在较高浓度（≈5×10mol）时，AVMs作为GABA的激动剂引起突触前GABA释放，进而引起细胞膜对氯离子通道性增加，从而导致由GABA介导的神经-肌肉间及中枢神经系统传导阻滞；但后来发现，AVMs在较低浓度时（≈2×10mo1）能引起与GABA系统无关的氯离子通道的开放。因此，本文拟以异育银鲫（*Carassais auratus gibebio*）为研究对象，通过研究不同浓度条件下

AVM对ARs以及对GABA合成、代谢酶的影响，探索AVM引起鱼类神经症状的原因和机理。另外，虽然目前在水产养殖上，虽然有大量关于AVM对不同水产动物的急性毒性[96, 223-225]、药物残留[129, 226]及不同剂型疗效[95]等方面的研究，但未见有研究AVM是否能通过鱼类血脑屏障进入其大脑组织的研究；因此本文拟通过研究不同浓度下大脑组织中AVM含量变化其及在外周组织的残留情况，拟为鱼类血-脑屏障药物渗透性研究、AVM神经毒性及其在水产养殖上的临床应用提供参考。

46

## **3.1** 材料与方法

### **3.1.1** 材 料

#### **3.1.1.1** 实验动物

参照第四章，其中试验鱼只采用体重为60.04±5. 02 g异育银鲫。

#### **3.1.1.2** 主要仪器、试剂和药品

**（1）主要仪器**

Agilent-1100型高效液相色谱仪（四元泵、自动进样器、柱温箱、G1321A荧光检测器）、超纯水系统（purelab prima120）、漩涡混合器、精密电子天平（Mettler AB104-N）、氮气吹干仪和高速冷冻离心机（Allegrax-15R）、分光光度计（DU800，

Beckmann）、电子天平（BS110S）、超低温冰箱（MDF-U5410, Sanyo）、紫外成像系统（Syngene）、电泳仪（DYY-10C，北京六一）、电泳槽（DYCP-31DN，北京六一）、无菌操作台（SW-CJ-2F，苏净集团）、荧光定量PCR仪（CFX9, Bio-Rad）、

PCR仪（Mastercycler Gradient, Eppendorf）。

1.5mL离心管、0.2mL薄壁PCR管、各式吸头均为AXYGEN公司产品。

**（2）主要试剂和药品**

AVM标准品、N-甲基咪唑、三氟乙酸酐购自Sigma公司。AVM[由武汉科洋生物工程有限公司](http://www.baidu.com/link?url=-C5MGJqjJ4zBBpC8yDF8xDh8vibiAlBaHXUYr9UONBu)提供；总mRNA 提取试剂盒（D9108A）、反转录试剂盒

（DRR036A）、D500 DNA Marker（D525A）均购自Takara公司；荧光定量PCR试剂盒（IQ sybr Green Supermix）购自Bio-Rad公司；氯仿、异丙醇、正己烷、乙腈、甲醇、四丁基溴化铵等均由国药集团化学有限公司购进且正己烷、乙腈、甲醇、四丁基溴化铵为HPLC级。

其中主要试剂配置：

衍生化试剂A: N-甲基咪唑：乙腈=1: 1（v/v）衍生化试剂B：三氟乙酸酐：乙腈=1: 2（v/v）

### **3.1.2** 方法

#### **3.1.2.1** 阿维菌素急性毒性试验

试验根据《新兽药特殊毒性试验技术要求》[227]设计，AVM采用泼洒用药。根据在最低剂量组试验鱼不发生死亡率＜20%；最高剂量组试验鱼全部死亡或者死亡率＞80%原则，通过预试验得到正式试验的药物区间（最低与最高剂量）范围；再根据确定的区间范围利用等对数间距法[228]确定各试验组药物浓度。正式急性毒性试验分5个浓度组，每个浓度组分3个平行，每个平行10尾。试验鱼发生死亡判断标准：呼吸停止并对外界刺激无反应，即中毒后鳃盖完全停止活动且鱼体对外界

47

（如玻璃棒或镊子）刺激在30s内没有产生反应确定为死亡[229]。

#### **3.1.2.2** 给药方式

AVM根据前期试验所得到的24 h、48 h及96 h LC50及安全浓度（Safe Concentration, SC）（0.127、0.071、0.039、0.0039 mg/L）泼洒用药。

#### **3.1.2.3** 样品采集

##### （**1**）半数致死浓度组织样品

AVM根据1.1.2.1中所得到相应半数致死浓度泼洒用药。每个半数致死浓度试验分为3组，每组20尾；并于用药后对应的时间点（第24 h、第48 h、第96 h）采集大脑、肝脏、肾脏、肌肉等四种组织样品用于AVM组织残留检测。另外，上述组织各取约2.0 g, -80℃保存用于提取总mRNA。

##### （**2**）**AVM**安全浓度组织样品

选择300尾经过暂养的健康异育银鲫随机分成6组，每组50尾；按照安全浓度

（前期试验得到为0.0039 mg/L）泼洒用药，分别于给药后0.083 h、0.25 h、0.5 h、1 h、2 h、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h、96 h、120 h、144 h、192 h等15个时间点各随机采集18尾异育银鲫大脑、肝脏、肾脏和肌肉组织样品，其中每6尾同一组织样品混合为1个液相检测样品，即每个时间点可以得到3个液相检测样品，放入-80℃冷冻保藏以用于AVM药物残留检测及提取总mRNA。给药前采取同一批试验鱼对应空白组织样品。

#### **3.1.2.4** **HPLC**组织样品处理**[129]**

准确称取鲫鱼大脑、肝脏、肾脏及肌肉（1.0±0.05）g组织匀浆，置于离心管中，再加入乙腈5 mL，涡旋4 min；超声5 min，再4000 rmp离心10 min后将上层有机相转至另一离心管中；残渣用乙腈4 mL重复提取1次；合并上清液，以相同转速再离心10 min，然后将上清液转至另一离心管中，置55℃水浴锅中氮气吹干，再向残余物中加入乙腈1 mL和正己烷4 mL，涡旋1 min，超声1 min，相同转速离心10 min，吸取下层有机相于另一离心管中，置55℃水浴锅中氮气吹干。

向离心管中加入衍生化试剂A液100μl，涡旋30 s，再加入衍生化试剂B液150

μL，涡旋30 s，密闭，室温下避光反应30 min，加入甲醇750μL至1 mL，水解30 min，经0.45μm有机微孔滤膜过滤，HPLC分析。

#### **3.1.2.5** 阿维菌素**HPLC**测定

##### （**1**）色谱条件[226]

色谱柱：ZORBAX SB2C-18分析柱(150 mm×4.6 mm, 5μm)；流动相：乙腈：水=98: 2（V/V）；检测器：荧光检测器；检测波长：激发波长365 nm，发射波长

48

475 nm；流速：1.5 mL /min；柱温：室温；进样量：20μl。

##### （**2**）标准曲线

将AVM标准品分别配制成0.01、0.025、0.05、0.25、0.5、2.5、5.0μg/mL标准液，经0.45μm滤膜过滤后HPLC分析。其中峰面积（*Ai*）为纵坐标，质量浓度（*C*）为横坐标绘制标准曲线。

##### （**3**）回收率和精密度

将0.25、0.5、2.5μg/g的AVM标准品添加到大脑、肝脏、肾脏及肌肉空白组织样品中，每个浓度3个平行，每个平行设一个空白对照，按照1.1.2.4中HPLC组织样品处理方法操作，以测定回收率、日内及日间精密度。

回收率（%）=样品实测浓度/样品理论浓度×100% 。

#### **3.1.2.6** 总**mRNA**提取、总**mRNA**质量及浓度测定

参照第四章。

#### **3.1.2.7** **RT-PCR**、**qPCR**

参照第四章。

### **3.1.3** 数据处理

#### **3.1.3.1** **AVM**急性毒性试验

运用SPSS17.0计算AVM 24 h LC50、48 h LC50和96 h LC50；安全浓度（SC）

=96 h LC50/10[230]。

#### **3.1.3.2** **AVM**测定

采用Microsoft Excel绘制药物标准曲线；利用DAS 3.0药代动力学软件计算药物代谢动力学参数。

#### **3.1.3.3** **AVM**对**GABAAR**及**GABA Th**成、代谢酶**mRNA**影响

数据以平均值±标准差表示。采用2-ΔΔCT法计算各基因表达变化。运用SPSS

17.0进行一维方差分析，其中*P* <0.05 和*P* <0.01表示差异显著和差异极显著。

## **3.2** 结果与分析

### **3.2.1** 阿维菌素急性毒性

#### **3.2.1.1** **AVM**对异育银鲫半数致死浓度结果

AVM试验鱼体重为60.04±5.02 g。通过预试验得到AVM正式试验的最低与最高浓度分别为0.02和0.30 mg/L。正式急性毒性试验采用等对数间距法确定试验

AVM浓度为0.20、0.039、0.077、0.152、0.30 mg/L，其中AVM用药后异育银鲫出现死亡时间及死亡数见表3-1. 运用SPSS17.0计算得到AVM 24 h、48 h和96 h半数致死浓度（LC50）分别为0.127、0.071和0.039 mg/L，因此计算得到AVM 安

49

全浓度（SC）为0.0039 mg/L。具体结果见表3-2。

表3-1 AVM 对异育银鲫急性毒性试验结果

Tab. 3-1 Acute toxicity test results of AVM to*C. auratus gibelio*

| 浓 度  Concentration(mg/L) | 出现症状时间（h） | 发生死亡时间（h） | 试验鱼总数  numbers | 死亡数（Deaths） | | |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 24h | 48h | 96h |
| 0.020 | 60 | 84 | 20 | 0 | 0 | 4 |
| 0.039 | 52 | 70 | 20 | 0 | 2 | 10 |
| 0.077 | 30 | 60 | 20 | 5 | 10 | 14 |
| 0.152 | 18 | 30 | 20 | 10 | 20 | 20 |
| 0.300 | 6 | 10 | 20 | 20 | 20 | 20 |

表3-2 AVM 对异育银鲫急性毒性试验结果

Tab. 3-2 Acute toxicity test results of AVM to*C. auratus gibelio*

|  | 浓度（mg/L） | 95%置信区间 |
| --- | --- | --- |
| 24H LC50 | 0.127 | 0.104~0.150 |
| 48H LC50 | 0.071 | 0.059~0.083 |
| 96H LC50 | 0.039 | 0.028~0.050 |
| 安全浓度 | 0.0039 | / |

#### **3.2.1.2** 临床症状

按照表3-2中AVM 24h LC50、48h LC50及96h LC50浓度泼洒用药后，试验鱼开始均出现不安、易惊、上下乱窜、表现出呼吸困难、呼吸频率加快等症状；而随着时间的增加，呼吸速率逐渐变慢，之后试验鱼呈现侧翻、平躺于水底，最后发生死亡。

### **3.2.2** 阿维菌素组织残留测定

#### **3.2.2.1** **AVM**检测方法学确证

高效液相色谱图显示AVM保留时间为4.08 min（图3-1），结果显示AVM能与杂质较好地分离、基线平稳；其最低检测限为0.01μg/mL，且在0.01~5μg/mL浓度范围内呈线性关系（图3-2），AVM回归方程及相关系数分别为*y*=258.31*x*+11.118，

*R2*=0.996.

组织样品按1.2.6.1处理方法操作后，测得大脑、肝脏、肾脏及肌肉组织中AVM的平均回收率处于85.75%~97.48%之间；其日内精密度系数均不大于5%；日间精密度系数均不大于5.8%；以上数据提示本方法符合本试验药代动力学研究的技术要求。

50

图 3-1 AVM标准色谱图 图3-2 AVM标准曲线

Fig. 3-1 Standard HPLC chromatogram of AVM

Fig. 3-2 Standard curve of AVM

#### **3.2.2.2** **AVM**组织残留检测结果

##### （**1**）**AVM**半数致死浓度下大脑及外周组织残留结果

AVM根据之前试验所得到的24h、48h及96h半数致死浓度（0.127、0.071、0.039

mg/L）泼洒用药，根据1.1.2中的相关方法检测各组织中AVM残留情况。检测结果见表3-3，其中在上述三个半数致死浓度下，AVM均能渗透进入异育银鲫大脑，24 h LC50浓度下大脑中AVM含量最高为0.292±0.005μg/g，且三个半数致死浓度之间渗透进入大脑的AVM残留量差异均极显著（图3-3），大脑中AVM含量与用药浓度正相关。另外，各半数致死浓度下均以肝脏AVM残留量最大，肾脏次之，大脑虽较肌肉AVM残留量大但差异不显著。

表3-3 半数致死浓度下AVM组织残留结果（μg/g）

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 组 织  Tissues | 大 脑  Brain | 肝 脏  Liver | 肾 脏  Kidney | 肌 肉  Muscle |
| 24h LC50 | 0.292±0.005 Eab | 0.940±0.146 Cd | 0.339±0.015 Cb | 0.126±0.013 Ca |
| 48h LC50 | 0.118±0.001 Ca | 0.275±0.062 Ac | 0.302±0.027 Cc | 0.073±0.005 Aa |
| 96h LC50 | 0.069±0.004 Aa | 0.160±0.041 Ad | 0.139±0.016 Ac | 0.065±0.003 Aa |

Tab. 3-3 Tissue residual of AVM following LC50 of 24h,48h and 96h（μg/g）

注：同一行上标小写字母相同者差异不显著（*P*> 0.05），字母不同者差异显著（*P*<0.05或*P*<0.01）；同一列上标大写字母相同者差异不显著（*P*> 0.05），字母不同者差异显著（*P*<0.05或*P*<0.01）。

Note: Values with same lowercase letters superscripts in the same row or with same capital letters superscripts in the same column mean no difference (*P*> 0.05), with different lowercase letters superscripts in the same row or with different capital letters superscripts in the same column mean significant difference(*P*<0.05 or *P*<0.01)．

51



图3-3 半数致死浓度下AVM组织残留结果（μg/g）

Fig. 3-3 Tissue residual of AVM following LC50 of 24h,48h and 96h（μg/g）

##### （**2**）安全浓度下**AVM**大脑及外周组织残留结果

AVM根据之前试验所得到的安全浓度（0.0039 mg/L）泼洒用药，根据1.1.2中的相关方法检测各组织中AVM残留情况。AVM在各组织中浓度-时间数据经DAS 3.0药物代谢动力学软件拟合后发现符合非房室模型，其代谢动力学参数见表3-4，其中四种组织中AVM主要药代动力学参数表现为：①达峰时间（*Tmax*）：肌肉>大脑>肝脏>肾脏；②峰浓度（*C*max）：肝脏>肾脏>肌肉>大脑；③末端消除半衰期（*T*1/2*β*）：肝脏>大脑>肾脏>肌肉；④药时曲线下面积（AUC）：肝脏>肾脏>大脑>肌肉。

大脑及肝脏、肾脏、肌肉组织AVM残留结果见表3-5或者图3-4。在整个试验过程中，大脑组织跟其他三种组织一样，均能检测到AVM存在。

表3-4 AVM安全浓度下各组织药物代谢动力学参数

Tab. 3-4 Pharmacokinetic parameters of AVM in different tissues following safe concentration

| 药代动力学参数  Parameters | 大 脑  Brain | 肝 脏  Liver | 肾 脏  Kidney | 肌 肉  Muscle |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 达峰时间  Tmax (h) | 2 | 3 | 96 | 0.5 |
| 峰浓度  Cmax (μg/g) | 0.0202 | 0.1392 | 0.0510 | 0.0270 |
| 末端消除半衰期  T1/2Z(h) | 114.882 | 428.038 | 39.849 | 38.873 |
| 表观分布容积  Vz/F(L/kg) | 186.615 | 130.493 | 43.713 | 70.353 |
| 清除率  CLz/F (l/ kg • h) | 1.126 | 0.211 | 0.760 | 1.254 |
| 药时曲线下面积  AUC（μg/mL•h） | 3.553 | 18.933 | 5.262 | 3.189 |

52

表3-5 AVM安全浓度下各组织残留结果（μg/g）

Tab. 3-5 Tissue residuals of AVM following the safe concentration（μg/g）

| 时间  Time(h) | 大 脑  Brain | 肝 脏  Liver | 肾 脏  Kidney | 肌 肉  Muscle |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 0.083 | 0.0120±0.0015 | 0.0156±0.0048 | 0.0168±0.0062 | 0.0170±0.0042 |
| 0.25 | 0.0158±0.0019 | 0.0207±0.0055 | 0.0098±0.0014 | 0.0156±0.0058 |
| 0.5 | 0.0187±0.0170 | 0.0324±0 .0088 | 0.0145±0.0040 | 0.0271±0.0066 |
| 1 | 0.0051±0.0009 | 0.0440±0.0059 | 0.0360±0.0040 | 0.0063±0.0013 |
| 2 | 0.0202±0.0067 | 0.0372±0.0079 | 0.0104±0.0028 | 0.0053±0.0017 |
| 3 | 0.0076±0.0019 | 0.1392±0.0219 | 0.0484±0.0025 | 0.0111±0.021 |
| 6 | 0.0065±0.0010 | 0.0126±0.0034 | 0.0211±0.0033 | 0.0214±0.0027 |
| 12 | 0.0118±0.0020 | 0.0211±0.0079 | 0.0356±0.0087 | 0.0231±0.0014 |
| 24 | 0.0108±0.0013 | 0.0346±0.0032 | 0.0167±0.0021 | 0.0103±0.0014 |
| 48 | 0.0108±0.0010 | 0.0328±0.0081 | 0.0340±0.0069 | 0.0072±0.0004 |
| 72 | 0.0164±0.0017 | 0.0267±0.0043 | 0.0362±0.0094 | 0.0058±0.0010 |
| 96 | 0.0107±0.0032 | 0.0319±0.0052 | 0.0510±0.0037 | 0.0164±0.0016 |
| 120 | 0.0137±0.0028 | 0.0243±0.0046 | 0.0157±0.0025 | 0.0072±0.0006 |
| 144 | 0.0104±0.0015 | 0.0239±0.0079 | 0.0292±0.0089 | 0.0236±0.0036 |
| 192 | 0.0118±0.0011 | 0.0207±0.0064 | 0.0212±0.0056 | 0.0126±0.0012 |



图3-4 安全浓度下大脑、肝脏、肾脏、肌肉AVM药时曲线（μg/g）

Tab. 3-4 The concentration-time curves of AVM in brain, liver, kidney and muscle following the safe concentration（μg/g）

### **3.2.3** 阿维菌素对异育银鲫**GABAAR mRNA**表达影响结果

#### **3.2.3.1** **AVM**对异育银鲫大脑**AR**β**2**亚基影响结果

AVM根据前期试验所得到的24 h LC50、48 h LC50、96 h LC50及安全浓度

（0.127、0.071、0.039、0.0039 mg∙L-1）泼洒用药，采用荧光定量PCR方法测定端脑、中脑、小脑和延脑四个组织中AVM用药前后GABAARβ亚基表达变化情况。

53

结果显示（表3-6和表3-7）：AVM用药后，端脑、中脑、小脑、延脑组织中ARβ2a和ARβ2b mRNA在不同用药浓度及不同时间点，均表现为极显著下调；而且，延脑是端脑、中脑、小脑、延脑等四个组织中ARβ2a和ARβ2b mRNA下调最为明显的组织。另外，在AVM安全浓度下，0.083 h、2 h(Max)、120 h等三个时间点中，端脑、中脑、小脑、延脑四个组织中ARβ2a和ARβ2b mRNA的表达均以各组织中AVM残留量最大的时间点时下调幅度最小，说明在一定浓度（低浓度）范围内，大脑中AVM对ARβ2a和ARβ2bmRNA表达的影响与其浓度呈负相关。

表3-6 AVM对异育银鲫端脑、中脑、小脑及延脑ARβ2a mRNA表达影响结果

Tab. 3-6 ARβ2a mRNA expression effects of AVM on Tel, Mes, Cer and Med of *C. auratus gibelio*

| 时间点  Time pionts | 大脑残留  （μg/g）  Brain residual | 端脑（Tel） | 中脑（Mes） | 小脑（Cer） | 延脑（Med） |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 24h(LC50) | 0.292±0.005 | 0.47±0.08 ΔΔE | 0.52±0.08 ΔΔF | 0.41±0.04 ΔΔG | 0.06±0.01 ΔΔK |
| 48h(LC50) | 0.118±0.001 | 0.41±0.03 ΔΔG | 0.60±0.05 ΔΔD | 0.42±0.02 ΔΔG | 0.18±0.05 ΔΔG |
| 96h(LC50) | 0.069±0.004 | 0.49±0.04 ΔΔE | 0.72±0.08 ΔΔA | 0.59±0.03ΔΔA | 0.22±0.02 ΔΔC |
| 0.083h | 0.012±0.002 | 0.52±0.02 ΔΔC | 0.50±0.02 ΔΔF | 0.49±0.06 ΔΔE | 0.21±0.03 ΔΔE |
| 2 h(Max) | 0.020±0.007 | 0.57±0.04 ΔΔA | 0.62±0.04 ΔΔD | 0.51±0.04 ΔΔC | 0.24±0.06 ΔΔA |
| 120h | 0.014±0.003 | 0.54±0.06 ΔΔB | 0.65±0.05 ΔΔC | 0.23±0.02 ΔΔI | 0.13±0.01 ΔΔI |

注：24h(LC50)、48h(LC50) 96h（LC50）分别为AVM 24h、48h和96h半数致死浓度（0.127、

0.071和0.039 mg/L）所对应的第24h、48h和96h时间点；0.083h、2h(MAX)、120h为安全用药浓度（0.0039 mg/L）下对应时间点，其中2h（Max）为大脑中AVM最大残留对应时间点。

“Δ”和“ΔΔ”表示显著和极显著下调；同一列大写字母相同表示差异不显著，大写字母不同表示差异著或者极显著，下同。

Note: 24h(LC50) was the time point under the 24h median lethal concentration (0.127mg/L) of AVM, and the same as 48h(LC50) and 96h(LC50) which were 0.071 and 0.039 mg/L respectively.

And 0.083h、2h (Max)、120h were the time points f AVM under safe concentration(0.0039 mg/L), which at 2h there has a maximum residual of AVM in brain.

"Δ”and"ΔΔ“mean Significant or most Significant down-regulation. Values with same capital letters

Superscripts in the same column mean no difference (*P*> 0.05), with different capital letters superscripts in the same column mean significant difference (*P*<0.05 or *P*<0.01), the same as follow.

54

表3-7 AVM对异育银鲫端脑、中脑、小脑及延脑ARβ2b mRNA表达影响结果

Tab. 3-7 ARβ2b mRNA expression effects of AVM on Tel, Mes, Cer and Med of *C. auratus gibelio*

| 时间点  Time pionts | 大脑残留  （μg/g）  Brain residual | 端脑（Tel） | 中脑（Mes） | 小脑（Cer） | 延脑（Med） |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 24h(LC50) | 0.292±0.005 | 0.45±0.04 ΔΔA | 0.62±0.07 ΔΔC | 0.67±0.03 ΔΔE | 0.06±0.01 ΔΔH |
| 48h(LC50) | 0.118±0.001 | 0.27±0.05 ΔΔH | 0.49±0.06 ΔΔG | 0.68±0.04 ΔΔE | 0.19±0.02 ΔΔC |
| 96h(LC50) | 0.069±0.004 | 0.41±0.09 ΔΔD | 0.65±0.06 ΔΔA | 1.00±0.07 A | 0.20±0.01 ΔΔA |
| 0.083h | 0.012±0.002 | 0.37±0.03 ΔΔF | 0.479±0.07 ΔΔI | 0.74±0.08 ΔΔC | 0.18±0.02 ΔΔC |
| X h(Max) | 0.020±0.007 | 0.45±0.03 ΔΔA | 0.57±0.06 ΔΔE | 0.76±0.05 ΔΔC | 0.17±0.01 ΔΔD |
| 120h | 0.014±0.003 | 0.43±0.03 ΔΔB | 0.57±0.05 ΔΔE | 0.45±0.02 ΔΔG | 0.12±0.01 ΔΔF |

#### **3.2.3.2** **AVM**对外周组织**AR**β**2**亚基影响结果

AVM根据前期试验所得到的24 h LC50、48 h LC50、96 h LC50及安全浓度

（0.127、0.071、0.039、0.0039 mg/L）泼洒用药后，肝脏、肾脏、肌肉等外周组织中ARβ2亚基表达变化情况见表3-8和表3-9。结果显示，AVM用药后，肝脏、肾脏组织中ARβ2a mRNA表达显著上调，而肌肉组织中ARβ2a mRNA显著下调；而ARβ2b除肾脏组织在24 h（96 h LC50）时间点上显著上调之外，肝脏、肾脏、肌肉三种组织ARβ2b mRNA表达均表现为极显著下调。结果表明，肝脏、肾脏、肌肉三种外周组织中ARβ2a和ARβ2b mRNA表达的上、下调幅度与AVM用药浓度无关，且肌肉是AVM用药后，ARβ2a和ARβ2b mRNA表达均极显著下调的组织。

表3-8 AVM对异育银鲫肝脏、肾脏及肌肉ARβ2a mRNA表达影响结果

Tab. 3-8 ARβ2a mRNA expression effects of AVM on liver, kidney and muscle of *C. auratus gibelio*

| 时间点  Time pionts | 肝脏  liver | 肾脏  kidney | 肌肉  muscle |
| --- | --- | --- | --- |
| 24h(LC50) | 11.35±1.00 \*\*i | 115.63±5.65 \*\*g | 0.48±0.06 ΔΔE |
| 48h(LC50) | 17.32±1.99 \*\*k | 1.28±0.13 \*\*a | 0.08±0.01 ΔΔI |
| 96h(LC50) | 5.74±0.42 \*\*e | 2.17±0.07 \*\*bc | 0.26±0.06 ΔΔG |
| 0.083h | 2.25±0.22 \*\*c | 2.45±0.26 \*\*c | 0.93±0.08 ΔΔA |
| X h(Max) | 1.13±0.06 \*\*a | 10.76±0.36 \*\*e | 0.56±0.07 ΔΔC |
| 120h | 8.98±0.59 \*\*g | 2.35±0.27 \*\*bc | 0.48±0.05 ΔΔE |

注：X h（Max）肝脏、肾脏及肌肉中AVM大脑中最大残留对应时间点，分别为3h、96h和0.5h。

“\*”和“\*\*”表示显著和极显著上调，“Δ”和“ΔΔ”表示显著和极显著下调；同一列小写字母相同表示上调差异不显著，小写字母不同表示上调差异显著或者极显著；同一列大写字母相同表示下调差异不显著，大写字母不同表示下调差异显著或者极显著，下同。

Note: X h(Max) were the corresponding time points which there have maximum residuals of AVM in liver(3h), kidney(96h), and muscle(0.5h).

55

“\*" and" \*\*" mean Significant or most Significant up-regulation, while"Δ”and"ΔΔ“mean Significant or most Significant down-regulation. Values with same lowercase letters superscripts in the same column mean no difference (*P*> 0.05), with different lowercase letters superscripts in the same column mean significant difference (*P*<0.05 or *P*<0.01). Values with same capital letters superscripts in the same column mean no difference (*P*> 0.05), with different capital letters superscripts in the same column mean significant difference (*P*<0.05 or *P*<0.01), the same as follow.

表3-9 AVM对异育银鲫肝脏、肾脏及肌肉ARβ2b mRNA表达影响结果

Tab. 3-9 ARβ2b mRNA expression effects of AVM on liver, kidney and muscle of C. auratus gibelio

| 时间点  Time pionts | 肝脏  liver | 肾脏  kidney | 肌肉  muscle |
| --- | --- | --- | --- |
| 24h(LC50) | 0.55±0.08 ΔΔC | 11.87±0.92 \*\* | 0.78±0.06 ΔΔA |
| 48h(LC50) | 0.44±0.03 ΔΔG | 0.06±0.01 ΔΔG | 0.13±0.01 ΔΔK |
| 96h(LC50) | 0.47±0.07 ΔΔE | 0.09±0.02 ΔΔE | 0.56±0.09 ΔΔE |
| 0.083h | 0.15±0.03 ΔΔI | 0.17±0.03 ΔΔC | 0.33±0.04 ΔΔI |
| X h(Max) | 0.06±0.01 ΔΔK | 0.28±0.02 ΔΔA | 0.65±0.02 ΔΔC |
| 120h | 0.79±0.02 ΔΔA | 0.06±0.01 ΔΔG | 0.43±0.03 ΔΔG |

### **3.2.4** **AVM**对**GAD**、**GABA-T**影响研究

GABA是脑组织中最重要的神经递质，主要通过与ARs结合来实现中枢抑制作用。GABA在体内主要的合成和代谢途径称为GABA支路。在GABA支路中包含与体内GABA含量密切相关的GAD和GABA-T两类酶。GABA支路的第一个步骤就是在谷氨酸脱羧酶（GAD）的作用下，谷氨酸不可逆的脱去*α*位上的羧基形成GABA; GABA支路中的第二个酶是GABA-T能够催化GABA发生可逆变化生成琥珀酸半醛。而在体内，GAD存在GAD65和GAD67两种形式。因而本文开展了AVM对体内GAD和GABA-T影响的研究。

#### **3.2.4.1** **AVM**对异育银鲫体内**GAD**影响研究

##### （**1**）**AVM**对异育银鲫大脑**GAD**影响结果

AVM根据上述浓度泼洒用药后，采用荧光定量PCR方法首先测定了端脑、中脑、小脑和延脑四种组织中AVM用药后GAD65和GAD67 mRNA表达变化情况。结果显示（表3-10和表3-11），AVM用药后，端脑、中脑、小脑、延脑GAD65和GAD67 mRNA在不同用药浓度（LC50及安全浓度）及不同时间点，均表现为极显著下调。另外，延脑是端脑、中脑、小脑、延脑四种组织中GAD65和GAD67 mRNA下调最为明显的组织，且均以24 h（96 h LC50）时间点下调幅度最大。

56

表3-10 AVM对异育银鲫端脑、中脑、小脑及延脑GAD65 mRNA表达影响结果

Tab. 3-10 GAD65 mRNA expression effects of AVM on Tel, Mes, Cer and Med of *C. auratus gibelio*

| 时间点  Time pionts | 大脑残留  （μg/g）  Brain residual | 端脑（Tel） | 中脑（Mes） | 小脑（Cer） | 延脑（Med） |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 24h(LC50) | 0.292±0.005 | 0.23±0.02 ΔΔI | 0.21±0.04 ΔΔA | 0.29±0.04 ΔΔK | 0.09±0.02 ΔΔI |
| 48h(LC50) | 0.118±0.001 | 0.22±0.01 ΔΔI | 0.19±0.02 ΔΔE | 0.44±0.04 ΔΔE | 0.25±0.03 ΔΔA |
| 96h(LC50) | 0.069±0.004 | 0.17±0.03 ΔΔG | 0.12±0.01 ΔΔK | 0.41±0.02 ΔΔG | 0.23±0.03 ΔΔC |
| 0.083h | 0.012±0.002 | 0.33±0.02 ΔΔC | 0.16±0.01 ΔΔI | 0.40±0.03 ΔΔI | 0.24±0.03 ΔΔBC |
| X h(Max) | 0.020±0.007 | 0.27±0.02 ΔΔE | 0.18±0.02 ΔΔG | 0.52±0.02 ΔΔA | 0.17±0.01 ΔΔG |
| 120h | 0.014±0.003 | 0.36±0.01 ΔΔA | 0.20±0.02 ΔΔC | 0.47±0.01 ΔΔC | 0.20±0.02 ΔΔE |

表3-11 AVM对异育银鲫端脑、中脑、小脑及延脑GAD67 mRNA表达影响结果

Tab. 3-11 GAD67 mRNA expression effects of AVM on Tel, Mes, Cer and Med of C. auratus gibelio

| 时间点  Time pionts | 大脑残留  （μg/g）  Brain residual | 端脑（Tel） | 中脑（Mes） | 小脑（Cer） | 延脑（Med） |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 24h(LC50) | 0.292±0.005 | 0.45±0.04 ΔΔI | 0.43±0.09 ΔΔA | 0.39±0.09 ΔΔI | 0.09±0.01 ΔΔI |
| 48h(LC50) | 0.118±0.001 | 0.48±0.03 ΔΔG | 0.38±0.08 ΔΔC | 0.54±0.08 ΔΔE | 0.24±0.03 ΔΔA |
| 96h(LC50) | 0.069±0.004 | 0.32±0.05 ΔΔK | 0.23±0.02 ΔΔI | 0.61±0.09 ΔΔC | 0.19±0.01 ΔΔC |
| 0.083h | 0.012±0.002 | 0.85±0.09 ΔΔA | 0.31±0.05 ΔΔG | 0.39±0.02 ΔΔI | 0.19±0.02 ΔΔC |
| X h(Max) | 0.020±0.007 | 0.66±0.06 ΔΔE | 0.37±0.07 ΔΔDE | 0.48±0.06 ΔΔG | 0.14±0.02 ΔΔG |
| 120h | 0.014±0.003 | 0.81±0.08 ΔΔC | 0.36±0.07 ΔΔE | 0.66±0.03 ΔΔA | 0.16±0.03 ΔΔE |

##### （**2**）**AVM**对异育银鲫外周组织中**GAD**影响结果

另外，本研究测定了肝脏、肾脏和肌肉等三种外周组织中AVM用药后GAD65和GAD67 mRNA表达变化情况。表3-12和3-13显示，除了24h（96h LC50）肾脏组织中GAD65和GAD67 mRNA表达显著上调之外，肝脏、肾脏、肌肉三种外周组织中，GAD65和GAD67 mRNA在不同用药浓度及不同时间点，均表现为极显著下调；并且其上下调与AVM用药浓度无关。另外，在GAD65和GAD67 mRNA表达下调的外周组织中，又以肌肉组织表现最为显著，其中GAD65 mRNA下降到正常组织的1.13±0.15~0.20±0.04（×10 -2）倍；GAD67 mRNA下降到正常组织的2.34±0.15~ 0.34±0.05（×10 -1）倍；而GAD65和GAD67 mRNA表达也存在差异，GAD67

mRNA表达下调幅度较GAD65更大。

57

表3-12 AVM对异育银鲫肝脏、肾脏及肌肉GAD65 mRNA表达影响结果

Tab. 3-12 GAD65 mRNA expression effects of AVM on liver, kidney and muscle of C. auratus gibelio

| 时间点  Time pionts | 肝脏  liver | 肾脏  kidney | 肌肉（×10 -2）  muscle |
| --- | --- | --- | --- |
| 24h(LC50) | 0.32±0.03 ΔΔA | 90.32±10.88 \*\* | 0.44±0.10 ΔΔE |
| 48h(LC50) | 0.24±0.04 ΔΔG | 0.38±0.04 ΔΔG | 0.20±0.04 ΔΔH |
| 96h(LC50) | 0.27±0.03 ΔΔE | 0.36±0.06 ΔΔI | 0.29±0.02 ΔΔG |
| 0.083h | 0.09±0.01 ΔΔK | 0.52±0.05 ΔΔE | 1.13±0.15 ΔΔA |
| X h(Max) | 0.11±0.0 ΔΔI | 0.64±0.05 ΔΔC | 0.20±0.02 ΔΔH |
| 120h | 0.30±0.04 ΔΔC | 0.56±0.07 ΔΔA | 0.87±0.23 ΔΔC |

表3-13 AVM对异育银鲫肝脏、肾脏及肌肉GAD67 mRNA表达影响结果

Tab. 3-13 GAD67 mRNA expression effects of AVM on liver, kidney and muscle of C. auratus gibelio

| 时间点  Time pionts | 肝脏  liver | 肾脏  kidney | 肌肉（×10 -1）  muscle |
| --- | --- | --- | --- |
| 24h(LC50) | 0.70±0.08 ΔΔA | 396.34±15.72 \*\* | 0.34±0.05 ΔΔK |
| 48h(LC50) | 0.22±0.02 ΔΔI | 0.27±0.03 ΔΔG | 0.49±0.04 ΔΔI |
| 96h(LC50) | 0.23±0.02 ΔΔG | 0.35±0.04 ΔΔE | 0.62±0.02 ΔΔE |
| 0.083h | 0.39±0.06 ΔΔE | 0.06±0.01 ΔΔI | 1.86±0.19 ΔΔC |
| X h(Max) | 0.05±0.01 ΔΔK | 0.39±0.03 ΔΔA | 0.57±0.06 ΔΔG |
| 120h | 0.41±0.03 ΔΔC | 0.36±0.04 ΔΔC | 2.34±0.15 ΔΔA |

#### **3.2.4.2** **AVM**对**GABA-T**影响结果

采用荧光定量PCR测定了AVM根据上述浓度泼洒用药后，端脑、中脑、小脑、延脑、肝脏、肾脏及肌肉七种组织中GABA-T mRNA表达变化情况。结果显示（表3-14和3-15），AVM用药后，端脑、中脑、小脑延脑等大脑组织GABA-T mRNA表达均显著下调，说明AVM用药后，异育银鲫大脑中GABA的代谢减缓；而肝

脏、肾脏、肌肉三种外周组织中，除了肾脏组织在24（h 96 h LC50）时GABA-T mRNA

（1.32±0.07倍）表达显著上调之外，肝脏、肾脏、肌肉三种外周组织中GABA-T

mRNA均表现为极显著下调；并且其上下调与AVM用药浓度无关；另外，在安全用药浓度下，肝脏、肾脏、肌肉三种外周组织中GABA-T mRNA的表达均以AVM药物残留量最大时的下调幅度最大，说明AVM在低浓度用药时，肝脏、肾脏、肌肉组织中GABA-T mRNA表达可能跟其药物残留量呈正相关。

58

表3-14 AVM对异育银鲫端脑、中脑、小脑及延脑GABA-T mRNA表达影响结果Tab.3-14 GABA-T mRNA expression effects of AVM on Tel, Mes, Cer and Med of *C. auratus gibelio*

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 用药浓度  （mg/L） | 大脑残留  （μg/g）  Brain | 端脑（Tel） | 中脑（Mes） | 小脑（Cer） | 延脑（Med） |
| 24h(LC50) | 0.292±0.005 | 0.91±0.02 ΔΔA | 0.50±0.07 ΔΔH | 0.72±0.05 ΔΔE | 0.29±0.04 ΔΔK |
| 48h(LC50) | 0.118±0.001 | 0.67±0.02 ΔΔI | 0.36±0.03 ΔΔJ | 0.44±0.05 ΔΔK | 0.38±0.08 ΔΔI |
| 96h(LC50) | 0.069±0.004 | 0.83±0.02 ΔΔE | 0.66±0.05 ΔΔC | 0.68±0.05 ΔΔG | 0.64±0.07 ΔΔG |
| 0.083h | 0.012±0.002 | 0.91±0.04 ΔΔA | 0.63±0.04 ΔΔF | 0.53±0.06 ΔΔI | 0.91±0.09 ΔΔA |
| X h(Max) | 0.020±0.007 | 0.86±0.03 ΔΔC | 0.64±0.08 ΔΔE | 0.94±0.03 ΔΔA | 0.69±0.02 ΔΔE |
| 120h | 0.014±0.003 | 0.81±0.03 ΔΔG | 0.78±0.04 ΔΔA | 0.79±0.08 ΔΔC | 0.77±0.04 ΔΔC |

表3-15 AVM对异育银鲫肝脏、肾脏及肌肉GABA-T mRNA表达影响结果

Tab. 3-15 GABA-T mRNA expression effects of AVM on liver, kidney and muscle ofC. auratus gibelio

| 时间点  Time pionts | 肝脏  liver | 肾脏  kidney | 肌肉（×10 -1）  muscle |
| --- | --- | --- | --- |
| 24h(LC50) | 0.94±0.08 ΔΔA | 1.32±0.07 \*\* | 0.32±0.05 ΔΔI |
| 48h(LC50) | 0.60±0.07 ΔΔE | 0.35±0.05 ΔΔG | 0.43±0.03 ΔΔG |
| 96h(LC50) | 0.53±0.06 ΔΔG | 0.91±0.09 ΔΔA | 0.53±0.05 ΔΔE |
| 0.083h | 0.45±0.09 ΔΔI | 0.55±0.04 ΔΔC | 0.86±0.08 ΔΔC |
| X h(Max) | 0.23±0.02 ΔΔK | 0.26±0.02 ΔΔI | 0.44±0.02 ΔΔG |
| 120h | 0.80±0.03 ΔΔC | 0.47±0.04 ΔΔE | 0.94±0.05 ΔΔA |

## **3.3** 讨论

### **3.3.1** **AVM**对异育银鲫毒性

关于AVM急性毒性，由于其属高毒类物质，且主要为神经毒性；同时，由于其具有优良、广谱抗寄生虫作用而被广泛应用；因此在许多水生生物上有过相关研究，如阿维菌素对大型蚤的LC50为0.34 mg/kg [231]；对虹鳟[232]、斑马鱼[222]、蓝鳃太阳鱼[221, 233]、锦鲫[223]、鲟鱼[233]的96h LC50分别为0.0032、0.0504、0.0096、0.1131、

5.036 mg/L. 杨代勤等[234]研究认为阿维菌素对黄鳝的24 h、48 h、96 h的半致死浓度分别为0.0914、0.0745和0.0678 mg/L. 阿维菌素对草鱼24 h、48 h、96 h的LC50分别为0.54、0.49、0.10 mg/L[235]. 徐文彦等[96]研究得出阿维菌素对黄河鲤的24 h、48 h和96 h半致死浓度分别为8.72×l0 -3、7.85×l0 -3、6.97×l0 -3 mg/L。

另外，关于AVM对于异育银鲫的急性毒性，周帅等[95]研究了2%阿维菌素水乳剂对异育银鲫（体重为1.98±0.35 g）的96 h LC50为1.15 mg/L；王锡珍等[98]阿维菌素对体重为27.41±3.83 g异育银鲫24 h、48 h、72 h和96 h LC50分别为0.21 mg/L、

59

0.14 mg/L、0.08 mg/L、0.06 mg/L. 而本文中AVM对体重为60.04±5.02 g和5.79±0.9

3g异育银鲫的24 h、48 h和96 h半致死浓度分别为0.127、0.071、0.039 mg/L和0.069、

0.053、0.027 mg/L（表3-2）。上述结果说明AVM对异育银鲫毒性大小与其体重密切相关。本文中，AVM对体重为60.04±5.02 g异育银鲫24 h、48 h和96 h半致死浓度均较其对体重为5.79±0.93 g异育银鲫相应半数致死浓度大，说明阿维菌素对异育银鲫的毒性随着体重的增加而呈递减趋势。另据我国环境保护局制订的《生物技术检测规范（水环境部分）》[236]，将药物对水生动物的毒性分为5个等级：LC50＜1

mg/L为剧毒，LC50在l～100 mg/L为高毒，LC50在100～1000 mg/L为中等毒性，LC50

在1000～10000 mg/L为低毒，LC50> 10000 mg/L为微毒或无毒。因此，阿维菌素对异育银鲫毒性属剧毒。

### **3.3.2** **AVM**血脑屏障渗透性

一般来讲，药物会因机体血脑屏障的存在使之难以进入脑组织，因此，药物的是否具有对BBB的穿透力是判断其神经毒性的重要指标。目前，评价药物BBB通透性的方法主要有体外评价、体内评价以及数学模型法等，其中体内评价方法主要是测定实验动物脑组织及脑脊液中的药物成分，脑组织匀浆法是考察药物

BBB通透性的体内评价方法之一[237]。

目前，在药物透过机体血-脑屏障、血-睾屏障、血-乳屏障等方面已经有大量的研究。在药物透过血-脑屏障研究方面，丁明玉等[238]研究认为川芎嗪能够透过血

-脑屏障。在血-乳屏障方面上，在克罗地亚，从初乳中检测出了包括阿莫西林在内的多种兽药[239]。Escudero等[240]从哺乳ft羊的乳中检测到阿维菌素表明其能透过血乳屏障。血睾屏障方面，Hoy等[241]研究表明阿维菌素能透过血睾屏障而产生毒性效应。近年来，关于AVM 引起动物中毒的病例时有报道，犬、猫、牛、骡驹等

AVM中毒临床上均表现明显的神经症状和神经器官损伤。有研究在中毒的柯里牧羊犬的中枢神经系统中检测到了高浓度AVM，证明AVM可透过柯里牧羊犬的血-脑屏障，导致机体中毒。目前，还未见有关于AVM是否能通过鱼类血脑屏障的报道。

因此，本文采用脑组织匀浆法，测定了AVM不同浓度下在异育银鲫大脑组织中的含量变化。结果显示，在AVM 24 h、48 h及96 h LC50（0.127、0.071、0.039 mg/L）及安全浓度（0.0039 mg/L）条件下，异育银鲫大脑中均检测到AVM存在

（表3-3、图3-3），说明AVM能渗透通过异育银鲫的BBB而进入大脑组织。另外，3个LC50浓度之间大脑组织中AVM残留量差异均极显著（表3-3），其中24 h LC50浓度下大脑中AVM含量最高为0.292±0.005 μg/g，结合安全浓度（0.0039

60

mg/L）条件下的大脑组织的测定结果（峰值：0.02μg/g），说明异育银鲫大脑组织中AVM的含量与其用药浓度呈正相关。

阿维菌素属于高毒类物质，主要表现出神经毒性。李术等[94]在研究阿维菌素对体外培养王鸽脑神经细胞影响时也有类似发现：神经细胞凋亡和细胞坏死呈现随阿维菌素剂量递增而增加的趋势。程广东等[242]通过体内研究发现鸽子AVM亚急性中毒时其脑组织存在细胞凋亡现象，且凋亡细胞的数量随着染毒剂量的升高而增加。Jencic等[232]研究发现，阿维菌素能对虹鳟的肝、肾、肠和脑组织等造成损伤。本文在不同浓度下从异育银鲫大脑组织中均检出AVM的存在，可以认为是

AVM具有神经毒性的药物基础，甚至是证明AVM具有神经毒性的直接证据。据倪彩霞等[243]研究提示，药物的脂溶性部位可能是其能作用于脑组织的前提

基础。有研究表明，强力霉素由于其脂溶性高而容易透过血脑屏障[244]。目前，对于AVM 进入异育银鲫大脑组织的机制尚不清楚，这可能与其脂溶性性质有关。

AVM为链霉菌发酵菌丝产生的一组大环内酯类药物，具有高度脂溶性[245]。

### **3.3.3** **AVM**组织残留

AVM作为一种新型、高效的鱼类抗寄生虫药剂，在国内外水产养殖中已被广泛使用。目前，虽然在草鱼[129]、南美白对虾[226]、斑点叉尾鮰[226]、鲈鱼[136]等水产动物上有许多关于AVM残留报到，但是对于AVM在水产动物上的药物代谢动力学方面鲜有研究。本文不但研究了3个半数致死浓度下肝脏、肾脏及肌肉组织中AVM残留情况（表3-5），而且还研究了AVM安全浓度（0.0039 mg/L）下肝脏、肾脏及肌肉三个组织AVM的代谢消除过程（图3-4）。半数致死浓度下各组织AVM残留结果显示：在同一组织中，均以24 h LC50浓度下的AVM残留量最大，且均极显著高于96 h LC50浓度下对应组织的残留量；另外在同一个LC50浓度下，肝脏、肾脏及肌肉3个组织中的AVM均以肝脏组织残留量最大，肾脏次之，肌肉中残留量最小。结果显示各组织中AVM残留量与其用药浓度也呈正相关。另外，AVM在各组织（包括大脑组织）中的浓度-时间数据经DAS 3.0药物代谢动力学软件拟合后发现符合非房室模型，这可能与AVM泼洒用药方式有关（AVM泼洒用药时，药物可以通过经皮肤、鳃、黏膜及肠道等多种途径吸收）。各组织间达峰时间（*Tmax*）大小关系为：肌肉<大脑<肝脏<肾脏，肌肉组织中的达峰时间最短，这也可能与AVM经泼洒用药后，药物可以通过经皮肤、鳃、黏膜及肠道等多种途径吸收，而皮肤吸收面积最大且和肌肉接触紧密有关。各组织间末端消除半衰期（*T*1/2Z）：肝脏>大脑>肾脏>肌肉，这可能与肝脏、大脑组织中脂肪含量较高有关，而AVM具有高度的脂溶性[245]。

61

### **3.3.4** **AVM**对**AR**β**2**亚基影响

目前，关于药物与ARs的研究有很多，但多数研究集中在药物对于GABAAR敏感性方面。例如蝇蕈醇被认为是GABAAR一种强烈的激动剂，它可以作用于GABAAR，使C1-内流增强，引起突触后膜超极化，其作用比GABA强l0倍。巴比妥类药物可以通过变构调节增加GABAA受体和GABA、苯二氮卓类激动剂的结合。荷包牡丹碱（Bic）作为GABA的选择性拮抗剂，ARs对其敏感，并受到苯二氮卓类药物（BDZ）和巴比妥盐酸（Barbiturates）的调节[246, 247]。而苯二氮卓类药物既包含有ARs的激动剂，又包含有ARs的拮抗剂甚至其反向激动剂。氯丙嗪

（Chlorpromazine, CPZ）是一种具有很强镇静作用的中枢镇静药，CPZ很可能通过与GABA受体的相应位点结合，激活GABA受体结合能力，使的GABA受体最大结合量（Bmax）增加，达到镇静效果。临床上，经CPZ处理过的小鼠往往躲在一角、活跃程度明显降低，表现出类似GABA的镇静、抗惊厥等作用[248]。而在药物引起的受体本身数量上的变化关注较少。张蓉等[249]利用游泳方式建立了大鼠的运动性疲劳动物模型，用荧光定量PCR技术测得小鼠海马部位和纹状体部位GABAARα1 mRNA表达升高；同时还发现模型组小鼠在采用疏肝方剂四逆散、健脾方剂四君子汤干等中药制剂预之后，海马及纹状体部位的GABAARα1 mRNA表达水平下降，而补肾方剂金匮肾气丸则对受体mRNA的调节作用不明显。另外有研究表明经氯丙嗪处理的热应激组小鼠大脑皮层中的GABAA受体和GABAB受体两类受体增多出现上调现象[248]。本文中，AVM按照24 h LC50、48 h LC50、96 h LC50及安全浓度（0.127、0.071、0.039、0.0039 mg∙L-1）泼洒用药后，中枢神经系统中的端脑、中脑、小脑、延脑四种组织中ARβ2a和ARβ2b mRNA在不同用药浓度及不同时间点，均表现为极显著下调；而外周组织中，肝脏、肾脏组织中ARβ2a mRNA表达显著上调，而肌肉组织中ARβ2a mRNA显著下调；而ARβ2b除肾脏组织在24h

（96 h LC50）时间点上显著上调之外，肝脏、肾脏、肌肉三种组织ARβ2b mRNA表达均表现为极显著下调。虽然在外周组织中有部分组织的受体基因表达上调，但是前期我们证实ARs主要在中枢神经系统中分布，因此可以推论本试验条件下异育银鲫体在AVM用药后，其内ARβ2mRNA表达量总体呈下降趋势。另外有研究明确认为阿维菌素主要作用于GABA门控的氯离子通道[113]，本文中AVM用药后ARs的下调行为可能是机体对药物产生的抵抗性反应以减少AVM对机体带来的损伤。同时提示在水产养殖生产上在使用AVM杀虫之后，AVM可能通过改变ARs的数量而对非靶标生物（鱼类）产生兴奋或者抑制影响。

另外，在AVM用药后，中枢神经系统中以延脑部位的ARβ2a和ARβ2b mRNA

62

表达下调最为明显。而在异育银鲫发生AVM中毒出现呼吸速率逐渐变慢等临床症状，表明AVM用药后对其呼吸产生了抑制，这有可能与AVM极显著下调了延脑（鱼类的呼吸中枢）ARβ2a和ARβ2b mRNA表达有关。张献全等[250]通过制备二氧化碳潴留大鼠模型，研究发现GABAA受体的α1β2、γ2含量在与呼吸相关的脑干区域明显升高，提示二氧化碳潴留时的呼吸调节可能与含有α1β2、γ2亚单位的GABAA受体有关。另外有研究证实二氧化碳可以通过作用于GABAA受体而改变大鼠的呼吸状态[251, 252]。

### **3.3.5** **AVM**对**GABA**合成、代谢酶的影响

研究表明，AVM会对中枢神经系统中的酶类产生影响。严海娟等[223]研究发现

AVM对锦鲫脑组织中乙酰胆碱酯酶（AchE）和羧酸酯酶（CarE）两种代谢解毒酶均表现为抑制作用。另外，AVM用药后，大鼠大脑皮层中的谷氨酰胺合成酶（GS）、乳酸脱氢酶（LDH）和肌酸激酶（CK）活力升高，钙调神经磷酸酶（CaN）的活力降低，推测AVM 可通过改变神经代谢酶的活力对大鼠神经系统产生毒性作用

[253]. 本文结果显示AVM用药后对异育银鲫GAD、GABA-T也产生了影响。GAD方面，AVM用药后，大脑组织中，端脑、中脑、小脑和延脑四种组织中的GAD65和GAD67 mRNA表达均表现为极显著下调；而在外周组织中，除了24 h（96 h LC50）时间点上GAD65和GAD67 mRNA表达显著上调之外，肝脏、肾脏、肌肉三种外周组织中的GAD65和GAD67 mRNA在不同用药浓度及不同时间点上均表现为极显著下调。GABA-T方面，异育银鲫端脑、中脑、小脑延脑四种中枢神经组织中的GABA-T mRNA表达均显著下调；外周组织中除了肾脏组织在24 h（96 h LC50）时GABA-T mRNA表达显著上调之外（1.32±0.07倍），其余均表现为极显著下调。结果表明AVM在异育银鲫体内对与GABA体内含量密切相关的GAD、GABA-T两种酶类的含量多数情况下降低的，而肾脏在24 h（96 h LC50）时不降反升的原因不明。

另有研究表明，阿维菌素能促进GABA的释放，增强GABA与GABA受体的结合，从而使氯离子内流增加，导致突触后膜超级化，导致神经信号传导阻滞、细胞功能丧失，进而出现神经毒性症状[117]。早期也有研究认为AVM作用机理为：在较高浓度（≈5×10 mol）时，AVM作为GABA的激动剂引起突触前GABA释放，进而引起细胞膜对氯离子通道性增加；但后来发现，AVM在较低浓度时（≈2×10 mo1）能引起与GABA系统无关的氯离子通道的开放。而从本文中AVM用药后对异育银鲫体内GAD、GABA-T两种酶类的变化趋势来看，无法判断机体内GABA的含量是增加还是减少，但有一点是肯定的，即AVM用药后，异育银鲫体内GABA的合成

63

及代谢速度均是减缓的。

## **3.4** 小 结

1、本试验条件下，异育银鲫在AVM用药后，其体内ARβ2mRNA表达量总体呈下降趋势。另外异育银鲫在AVM用药后产生的呼吸抑制可能与AVM极显著下调其延脑（鱼类呼吸中枢）ARβ2a和ARβ2b mRNA表达有关；

2、AVM在异育银鲫体内的GAD、GABA-T两种酶类的含量多数情况下降低的；另外，虽然难以判断异育银鲫体内GABA的含量是增加还是减少，但其合成及代谢速度均是减缓的；

3、本文中在不同浓度及不同时间点均能在异育银鲫大脑中检测到有AVM残留，表明，AVM能渗透通过异育银鲫的血脑屏障，其原因可能与其脂溶性性质有关。

64

# 第四章 基于**GABAA**受体的氟喹诺酮类药物对异育银鲫影响研究

氟喹诺酮类药物属于第三代喹诺酮类抗菌药，是自1984年诺氟沙星上市以来相继涌现的一大类含氟的喹诺酮类衍生物的总称。近年来，FQs因其具有抗菌谱广、抗菌活性强、与其他抗菌药物无交叉耐药性等特点而被广泛使用。随着其广泛被使用，其毒副作用也逐渐显现。有研究认为，FQs药物的毒性主要有中枢神经毒性、肝肾毒性、心脏毒性、胃肠道毒性、软骨毒性、生殖毒性等[144]。中枢神经毒性方面，氟喹诺酮类药物导致的中枢神经系统反应主要表现为头昏、情绪不安、失眠、眩晕等，易诱发癫痫，严重的神经毒性反应可产生幻觉、抑郁等神经疾病反应[145,

146]. 据统计，FQs引起神经系统毒性主要表现为精神异常及癫痫[147]。神经毒性方

面，邓艳萍[148]研究发现，在小鼠脑内注射依诺沙星、环丙沙星、氧氟沙星与司巴

沙星等5种氟喹诺酮类抗菌药能引起致惊厥作用。生殖毒性上，黄文颐等[153（]

1999)

按300、150、50 mg/kg的盐酸二氟沙星给受孕大鼠灌胃，结果高剂量组胎鼠存活率明显降低，盐酸二氟沙星显著影响胚胎的生长发育，其严重程度具有剂量效应关系。心脏毒性方面，有研究表明，氟喹诺酮类药物诱发尖端扭转性室速概率依次为司帕沙星>格帕沙星>加替沙星>左氧氟沙星>氧氟沙星>环丙沙星[150, 151]。

双氟沙星，又称二氟沙星，属第三代氟喹诺酮类抗菌药物，是我国农业部2000年批准的国家三类新兽药，由美国Abbott公司于1984年首次合成。因其对大多数革兰氏阳性菌和阴性菌、支原体及某些耐药菌株有很好的抗菌活性[143]，是水产养殖上常用的抗菌药物之一。另外有研究认为，DIF 的作用机制与抑制性神经递质

GABA相关[117, 148]，而GABA主要分布于大脑组织当中。而异育银鲫作为中国科学院水生生物研究所于1976~1981年研制成功的一种具有生长快、个体大、抗逆性强等特点的水产养殖品种，目前已经成为主要水产养殖品种之一，在许多地区的产量占淡水鱼产量的30％以上。因此，本文拟以异育银鲫为研究对象，通过研究不同剂量条件下DIF对ARs以及对GABA合成、代谢酶的影响，探索DIF引起鱼类神经症状的原因和机理。另外，虽然在猪[168]、鸡[170]以及水产养殖例如中华绒螯蟹[171]、牙鲆[172]、鲫鱼[173, 174]等水产经济动物上有大量关于DIF药代动力学方面的研究，但对于DIF是否能渗透通过鱼类血脑屏障进入其大脑组织的研究还未见有相关研究。因此本文拟通过研究96h LD50及临床推荐用药剂量（20 mg/kg）下大脑组织中DIF含量变化其及在外周组织的残留情况，拟为鱼类血-脑屏障药物渗透性研究、DIF神经毒性及其在水产养殖上的临床应用提供参考。

65

## **4.1** 材料与方法

### **4.1.1** 材料

#### **4.1.1.1** 实验动物

参照第四章，其中试验鱼只采用体重为60.04±5.02 g异育银鲫。

#### **4.1.1.2** 主要仪器、试剂和药品

##### （**1**）主要仪器参照第五章。

##### （**2**）主要试剂和药品

DIF标准品购自Sigma公司；DIF原料药（纯度为98%）由浙江国邦药业有限公司提供；总mRNA提取试剂盒（D9108A）、反转录试剂盒（DRR036A）、D500 DNA

Marke（r D525A）均购自Takara公司；荧光定量PCR试剂盒（IQ sybr Green Supermix）

购自Bio-Rad公司。乙腈、四丁基溴化铵为HPLC级（由国药集团公司购进）。

### **4.1.2** 方法

#### **4.1.2.1** 双氟沙星急性毒性试验

试验根据《新兽药特殊毒性试验技术要求》设计，DIF采用前肠单次口灌用药。根据在最低剂量组试验鱼发生死亡率＜20%；最高剂量组试验鱼全部死亡或者死亡率＞80%原则，通过预试验得到正式试验的药物区间（最低与最高剂量）范围；再根据确定的区间范围采用等对数间距法[228]确定各试验组药物剂量。正式急性毒性试验分5个剂量组，每组分3个平行共30尾。试验鱼发生死亡判断标准：呼吸停止并对外界刺激无反应，即中毒后鳃盖完全停止活动且鱼体对外界（如玻璃棒或镊子）刺激在30s内没有产生反应确定为死亡[229]。

#### **4.1.2.2** 给药方式

DIF在鱼类的临床用药剂量为5~20 mg/kg[254]。因此，本次试验采用临床用药剂量上限（20 mg/kg）给药及本文试验所得DIF 96 h LD50 2个剂量标准，根据对应体重用细导管将DIF灌入试验鱼前肠，无回吐现象的留作试验。其中96 h LD50（2840 mg/kg b. W.）由前期DIF急性毒性试验得到。

#### **4.1.2.3** 样品采集

##### （**1**）**96 h LD50**组织样品

试验分为3组，每组20尾；按照DIF 96 h LD50给药，并于试验第96 h采集大脑、肝脏、肾脏、肌肉等4种组织样品用于DIF含量测定；其中每6尾同一组织样品混合为1个液相检测样品，即每个时间点可以得到3个液相检测样品，放入-20℃冷冻保藏以用于HPLC检测。另在给药前采取同一批试验鱼对应空白组织样品。

66

##### （**2**）临床推荐剂量（**20 mg/kg**）组织样品

采用临床用药剂量上限（20 mg/kg）给药。选择480尾经过暂养的健康异育银鲫随机分成6组，分别于给药后0.083 h、0.25 h、0.5 h、1 h、2 h、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h、96 h、120 h、144 h、196 h、240h、288 h、336 h、408 h、480 h、

600 h、720 h、840 h、960 h等24个时间点分别采集大脑和肝脏、肾脏、肌肉组织样品，放入-20℃冷冻保藏至样品处理；给药前采取同一批试验鱼对应空白组织样品。

#### **4.1.2.4** 组织样品处理**[173]**

精确称取各组织匀浆样品1.000 g，置于离心管中，加入1 mol/L NaCl和0.2 mol/L PBS缓冲溶液（pH 7.4）各1 mL，再加入5 mL二氯甲烷进行药物萃取，旋涡混合振荡10 min后，4℃条件下8000 r/min离心10 min，取有机相；剩余残渣中再加入5 mL二氯甲烷，重复以上操作步骤进行第二次萃取，并合并两次有机相，于45℃恒温氮气条件下吹干，加1 mL流动相溶解后，加5 mL正己烷脱脂；混匀、离心后将下层液体经0.45μm有机微孔滤膜过滤，4℃保存至HPLC分析。

#### **4.1.2.5** 双氟沙星**HPLC**测定

##### （**1**）色谱条件

色谱柱为：ZORBAX SB2C-18分析柱（150 mm×4.6 mm, 5μm）；流动相为：乙腈：四丁基溴化氨（0.030 mol/L、pH3.1）=5: 95（V/V）；检测波长：278 nm；流速1.5 mL/min；柱温：40℃；进样量：10μL。

##### （**2**）标准曲线

配制0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1.0、5.0、10.0、20.0、50.0和100.0μg/mL

系列DIF标准品溶液，经0.45μm滤膜过滤后HPLC分析。以峰面积（*Ai*）为纵坐标，质量浓度（*C*）为横坐标绘制双氟沙星标准曲线。

##### （**3**）回收率和精密度

将0.1、1.0和10.0μg/mL的DIF标准品添加到大脑、肝脏、肾脏及肌肉空白组织样品中，每个浓度3个平行，每个平行设一个空白对照，按照1.1.2.4组织样品处理方法操作，以测定回收率、日内及日间精密度。

回收率（%）=样品实测浓度/样品理论浓度×100%

#### **4.1.2.6** 总**mRNA**提取、总**mRNA**质量及浓度测定

参照第四章。

#### **4.1.2.7** **RT-PCR**、**qPCR**

参照第四章。

67

### **4.1.3** 数据处理

#### **4.1.3.1** **DIF**急性毒性试验

DIF 96h半数致死量按照下列公式计算：



其中：Xk为最高对数剂量；i为相邻两对数剂量的差值；P为各剂量组的死亡率；

Pm为最高剂量死亡率；Pn为最低剂量死亡率。

#### **4.1.3.2** **DIF**组织残留测定

采用Microsoft Excel绘制药物标准曲线；利用DAS 3.0药代动力学软件计算药物代谢动力学参数。

#### **4.1.3.3** **DIF**对**AR**β**2**及**GABA Th**成、代谢酶**mRNA**影响

-ΔΔCT

数据以平均值±标准差表示。采用2法计算各基因表达变化。运用SPSS

17.0进行一维方差分析，其中*P* <0.05 和*P* <0.01表示差异显著和差异极显著。

## **4.2** 结果与分析

### **4.2.1** 双氟沙星急性毒性试验

#### **4.2.1.1** **DIF**急性毒性试验结果

DIF试验鱼为体重为60.04±5.02 g。通过预试验得到DIF正式试验时的最低、最高剂量为2000 mg/kg和4000 mg/kg。正式急性毒性试验剂量分别为2000、2378.209、

2828.134、3363.179和4000 mg/kg. DIF按照上述5个剂量标准前肠单次口灌用药后，各剂量组出现死亡的时间及死亡数量见表4-1；另根据1.1.3中DIF半数致死量公式计算得到DIF对异育银鲫96 h半数致死剂量为2839.6839 mg/kg≈2840 mg/kg。

表4-1 DIF对异育银鲫急性毒性试验结果

Tab. 4-1 Acute toxicity test results of DIF to*C. auratus gibelio*

| 剂量 （Dose） | | | | | | |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 组别  Groups | mg/kg | 对数值Logarithm Values | 试验鱼数量  Numbers | 死亡时间  Time(h) | 死亡数  Deaths | 死亡率  Mortality(p) |
| 1 | 2000.000 | 3.30100 | 30 | 86 | 5 | 0.167 |
| 2 | 2378.209 | 3.37625 | 30 | 72 | 9 | 0.300 |
| 3 | 2828.134 | 3.45150 | 30 | 56 | 14 | 0.467 |
| 4 | 3363.179 | 3.52675 | 30 | 36 | 20 | 0.667 |
| 5 | 4000.000 | 3.60200 | 30 | 6 | 26 | 0.867 |
| 合计: | / | / | 150 | / | / | ∑p=2.468 |

68

#### **4.2.1.2** **DIF**（**96 h LD50**）用药后临床症状

DIF按照上述5个剂量标准前肠单次口灌用药后，各剂量组均出现急躁不安，呼吸频率加快且不规则，快速游动并上浮；随着时间的增加，试验鱼体态出现侧翻，有的变形呈弯月形；焦躁不安、乱窜、甚至出现腹部朝上、“头上尾下”等异常体态，有些鱼胸鳍、臀鳍还出现僵直、震颤等类似神经异常症状。

另外，根据DIF急性毒性试验所得到的96 h LD50（2840 mg/kg）用药后，异育银鲫在用药后第16 h开始表现急躁不安，呼吸频率加快且不规则，快速游动并上浮；第49 h左右体态出现侧翻呈弯月形，焦躁不安，极速游动，在水中呈“头上尾下”异常体态等，随着用药时间的增加，有些试验鱼表现腹部朝上等异常体态，同时胸鳍和臀鳍呈僵直、震颤等类似神经异常症状。另据1.1.2.1中的试验鱼死亡判断标准，异育银鲫在用药后第66 h开始出现死亡。

### **4.2.2** 双氟沙星组织残留研究

#### **4.2.2.1** **DF**检测方法学

高效液相色谱图显示DIF能与杂质较好地分离，基线平稳，重现性好，其保留时间为10.54 min（图4-1）。结果显示，DIF标准溶液在0.01~100μg/mL浓度范围内呈线性关系（图4-2），其回归方程为：*y*=43.885*x*+1.6226，相关系数：*R2*=1，其最低检测限为0.01 μg/mL。各组织样品按1.5处理方法操作后，其平均回收率均处于

90.2%~102.3%之间，日内精密度系数不大于3%，日间精密度系数不大于5.8%。以上数据提示本方法的灵敏度、精密度、稳定性均符合本试验药代动力学研究技术要求。

图 4-1 双氟沙星标准色谱图 图4-2 双氟沙星标准曲线

Fig. 4-1 Standard HPLC chromatogram of DIF

Fig. 4-2 Standard curve of DIF

#### **4.2.2.2** **96 h LD50**剂量下**DIF**组织残留结果

根据前期急性毒性试验所得到的96 h LD50（2840 mg/kg b. W）给药后，运用

69

本文所建立的方法测定了大脑、肝脏、肾脏、肌肉四种组织中DIF残留情况。结果显示，按照DIF 96 h LD50剂量给药后，第96h时大脑组织中DIF的含量为10.49±0.35μg/g，表明在96 h LD50剂量下，DIF能渗透通过异育银鲫血脑屏障而进入其大脑组织；另外，96 h LD50剂量下，上述四种组织中DIF的残留量高低次序为：肝脏>肌肉>大脑>肾脏；DIF在肝脏组织中的含量为73.36±2.17μg/g，极显著高于大脑、肾脏及肌肉中的含量（表4-2）；而作为机体主要排泄器官的肾脏，DIF含量最小，仅为4.33±0.35μg/g。

表4-2 96 h LD50各组织中DIF残留测定结果（μg/g）

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 组 织  Tissues | 大 脑  Brain | 肝 脏  Liver | 肾 脏  Kidney | 肌 肉  Muscle |
| 含 量  contents | 10.49±0.35 a | 73.36±2.17 c | 4.33±0.35 a | 26.48±2.07 a |

Tab. 4-2 DIF residuals of brain, liver, kidney and muscle following 96h LD50（μg/g）

注：同一行上标字母相同者差异不显著（*P*> 0.05），字母不同者差异显著（*P*<0.05或*P*<0.01）。Note: Values with same letter superscripts in the same row mean no difference (*P*> 0.05), with different letters superscripts mean significant difference(*P*<0.05 or *P*<0.01)．

#### **4.2.2.3** 大脑与外周组织中**DIF**消除结果

DIF采用临床用药剂量上限（20 mg/kg）单次前肠投喂给药，其各组织浓度-时间数据经DAS 3.0药物代谢动力学软件拟合均符合一级吸收开放性二室房室模型。另外，各组织中DIF主要代谢动力学参数（表4-3）表现为：①达峰时间（*Tmax*）：大脑=肾脏>肌肉>肝脏；②达峰浓度（*C*max）：肝脏>肾脏>肌肉>大脑；③消除半衰期（*T*1/2*β*）：大脑>肌肉>肾脏>肝脏；④药时曲线下面积（AUC）：肌肉>肾脏>肝脏>大脑。各组织中DIF消除过程（表4-4或者图4-3）显示，上述四种组织中，以大脑组织中的DIF消除过程最为平缓；且到试验最后5个时间点时，各组织中

DIF 含量接近（表4-5），到试验第960 h，大脑组织中DIF 含量最高，为

0.392±0.007μg/g。

表4-3 DIF（20 mg/kg）单次前肠投喂给药后各组织药物代谢动力学参数

Tab. 4-3 Pharmacokinetic parameters of DIF in tissues following a single oral gavage of 20 mg/kg

| 药代动力学参数  Parameters | 大 脑  Brain | 肝 脏  Liver | 肾 脏  Kidney | 肌 肉  Muscle |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 达峰时间  Tmax (h) | 12 | 0.5 | 12 | 6 |
| 达峰浓度  Cmax (μg/g) | 2.410 | 50.530 | 27.980 | 16.540 |

70

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 分布半衰期  *T*1/2α(h) | 9.089 | 0.442 | 23.805 | 25.686 |
| 消除半衰期  *T*1/2β(h) | 1157.713 | 32.822 | 89.612 | 195.367 |
| 吸收半衰期  *T*1/2Ka (h) | 7.125 | 0.220 | 0.444 | 1.473 |
| 表观分布容积  Vd(ss) (L/kg) | 6.825 | 0.296 | 0.842 | 1.075 |
| 体内清除率  CL (l/ kg • h) | 0.052 | 0.027 | 0.016 | 0.016 |
| 药时曲线下面积  AUC（μg/mL•h） | 381.054 | 746.622 | 1095.711 | 1222.750 |

表4-4双氟沙星（20 mg/kg）单次前肠投喂给药各组织残留结果（μg/g）Tab.4-4 Tissue residuals of DIF following a single oral gavage of 20 mg/kg（μg/g）

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 时间  Time(h) | 大 脑  Brain | 肝 脏  Liver | 肾 脏  Kidney | 肌 肉  Muscle |
| 0.083 | 0.725±0.0 22 | 1.078±0.093 | 1.532±0.160 | 0.144±0.011 |
| 0.25 | 0.962±0.062 | 23.322±3.125 | 14.908±2.316 | 0.905±0.162 |
| 0.5 | 1.123±0.057 | 50.526±5.234 | 8.582±0.832 | 1.148±0.148 |
| 1 | 1.239±0.077 | 24.228±2.865 | 19.713±3.315 | 7.892±1.238 |
| 2 | 1.339±0.098 | 23.613±3.678 | 23.387±3.021 | 13.810±2.210 |
| 3 | 1.497±0.053 | 13.524±1.876 | 17.552±1.688 | 14.867±1.863 |
| 6 | 1.101±0.034 | 13.789±1.432 | 18.887±1.982 | 16.543±1.895 |
| 12 | 2.412±0.159 | 10.406±1.128 | 27.983±3.521 | 14.885±1.638 |
| 24 | 1.323±0.083 | 10.508±0.965 | 12.746±1.862 | 14.861±1.862 |
| 48 | 1.073±0.055 | 5.587±0.482 | 5.417±0.36 5 | 5.323±0.478 |
| 72 | 1.261±0.090 | 2.796±0.132 | 2.574±0.214 | 3.678±0.231 |
| 96 | 1.313±0.027 | 1.657±0.112 | 2.394±0.182 | 1.996±0.178 |
| 120 | 1.530±0.011 | 0.998±0.095 | 2.348±0.285 | 1.818±0.159 |
| 144 | 0.720±0.050 | 0.922±0.086 | 2.723±0.196 | 1.746±0.133 |
| 192 | 0.900±0.024 | 1.069±0.120 | 1.858±0.143 | 1.523±0.210 |
| 240 | 0.505±0.045 | 1.001±0.089 | 0.668±0.091 | 0.606±0.013 |
| 288 | 0.473±0.037 | 2.431±0.108 | 0.585±0.043 | 0.545±0.013 |
| 336 | 0.540±0.104 | 0.751±0.123 | 0.432±0.071 | 0.571±0.011 |
| 408 | 0.757±0.160 | 0.570±0.054 | 0.955±0.113 | 0.889±0.120 |
| 480 | 0.542±0.157 | 0.395±0.029 | 0.537±0.071 | 0.562±0.013 |
| 600 | 0.276±0.008 | 0.248±0.004 | 0.379±0.037 | 0.283±0.011 |
| 720 | 0.248±0.011 | 0.236±0.003 | 0.494±0.041 | 0.239±0.007 |
| 840 | 0.245±0.11 | 0.229±0.004 | 0.265±0.011 | 0.246±0.002 |
| 960 | 0.392±0.007 | 0.260±0.007 | 0.378±0.011 | 0.250±0.030 |

71



图4-3双氟沙星（20 mg/kg）单次前肠投喂给药后大脑、肝脏、肾脏及肌肉组织药时曲线（μg/g）Fig.4-3 The concentration-time curves of DIF in brain, liver, kidney and muscle following a single oral gavage of 20 mg/kg（μg/g）

表4-5 双氟沙星（20 mg/kg）单次前肠投喂给药最后5个时间点各组织含量

Tab. 4-5 Tissue contents of DIF at the last five time points following a single oral gavage of 20 mg/kg

| 时间  Time(h) | 大 脑  Brain (μg/g) | 肝 脏  Liver (μg/g) | 肾 脏  Kidney (μg/g) | 肌 肉  Muscle (μg/g) |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 480 | 0.542±0.157 a | 0.395±0.029 c | 0.537±0.071 a | 0.562±0.013 a |
| 600 | 0.276±0.008 c | 0.248±0.004 c | 0.379±0.037 a | 0.283±0.011 c |
| 720 | 0.248±0.011 c | 0.236±0.003 c | 0.494±0.041 a | 0.239±0.007 c |
| 840 | 0.245±0.11 b | 0.229±0.004 c | 0.265±0.011 a | 0.246±0.002 b |
| 960 | 0.392±0.007 a | 0.260±0.007 c | 0.378±0.011 a | 0.250±0.030 c |

### **4.2.3** 双氟沙星对异育银鲫**AR**β**2**亚基影响研究

#### **4.2.3.1** **DIF**对大脑**AR**β**2**亚基影响结果

DIF根据前期试验所得到的96 h LD50（2840 mg/kg b. W.）及临床用药剂量上限（20 mg/kg）单次前肠投喂给药，采用荧光定量PCR方法测定端脑、中脑、小脑和延脑四个组织中DIF用药前后ARβ2亚基表达变化情况。结果显示（表4-6和表4-7）：DIF用药后（96 h LD50及20 mg/kg）端脑、中脑、小脑、延脑ARβ2a

mRNA的表达均极显著下调，从96h LD50及20 mg/kg用药后对ARβ2a mRNA的表达变化的对比来看，DIF对ARβ2a mRNA表达变化跟用药剂量无关，而随着用药后时间的延长呈现更加明显下调趋势。而DIF（96 h LD50及20 mg/kg）用药后，端脑、中脑、小脑和延脑的ARβ2b mRNA的表达除了延脑20 mg/kg用药条件下极显著下调之外，其余均上调，其中对端脑、中脑、小脑的上调随着用药时间的延长上调幅度下降。

72

表4-6 DIF对异育银鲫端脑、中脑、小脑及延脑ARβ2a mRNA表达影响结果

Tab. 4-6 ARβ2a mRNA expression effects of DIF on Tel, Mes, Cer and Med of *C. auratus gibelio*

| 时间点  Time pionts | 大脑残留  （μg/g）  Brain residual | 端脑（Tel） | 中脑（Mes） | 小脑（Cer） | 延脑（Med） |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 96h(LD50) | 10.49±0.35 | 0.91±0.09 ΔΔA | 0.98±0.04 ΔA | 0.73±0.03 ΔΔA | 0.56±0.06 ΔΔA |
| 0.083h | 0.725±0.022 | 0.62±0.05 ΔΔE | 0.98±0.03 ΔA | 0.32±0.02 ΔΔC | 0.39±0.05 ΔΔC |
| X h(Max) | 2.412±0.159 | 0.72±0.13 ΔΔC | 0.64±0.09 ΔΔC | 0.72±0.13 ΔΔA | 0.19±0.02 ΔΔG |
| 120h | 1.530±0.011 | 0.61±0.03 ΔΔE | 0.45±0.02 ΔΔE | 0.23±0.02 ΔΔE | 0.21±0.01 ΔΔE |

注：96h（LD50）为96h半数致死剂量（2840 mg/kg b. W.）用药后第96h时间点DIF残留量；

0.083h、Xh(Max)、120h为临床推荐剂量（20 mg/kg b. W.）下对应时间点DIF残留量，其中

12h为脑组织DIF最大残留对应时间点。

“Δ”和“ΔΔ”表示显著和极显著下调；同一列大写字母相同表示差异不显著，大写字母不同表示差异显著或者极显著，下同。

Note: 96h(LD50) was the time point under the 96h median lethal dose (2840 mg/kg b. W.) of DIF. And 0.083h、Xh (Max)、120h were the time points f DIF under clinical recommended dose (20 mg/kg b. W.), which at 12h there has a maximum residual of DIF in brain.

"Δ”and"ΔΔ“mean Significant or most Significant down-regulation. Values with same capital letters

Superscripts in the same column mean no difference (*P*> 0.05), with different capital letters superscripts in the same column mean significant difference (*P*<0.05 or *P*<0.01), the same as follow.

表4-7 DIF对异育银鲫端脑、中脑、小脑及延脑ARβ2b mRNA表达影响结果

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 时间点  Time pionts | 大脑残留（μg/g）  Brain residual | 端脑（Tel） | 中脑（Mes） | 小脑（Cer） | 延脑（Med） |
| 96h（LD50） | 10.49±0.35 | 39.24±6.71 \*\*e | 18.62±1.26 \*\*c | 17.27±1.96 \*\*d | 1.97±0.32 \*\* |
| 0.083h | 0.725±0.022 | 27.21±1.71 \*\*c | 22.56±1.08 \*\*e | 16.21±1.54 \*\*c | 0.78±0.08 ΔΔA |
| X h（Max） | 2.412±0.159 | 45.36±3.04 \*\*g | 13.07±1.41 \*\*a | 23.27±2.99 \*\*f | 0.51±0.05 ΔΔE |
| 120h | 1.530±0.011 | 17.06±1.34 \*\*a | 13.36±0.73 \*\*a | 10.17±1.16 \*\*a | 0.55±0.09 ΔΔC |

Tab. 4-7 AR*β*2b mRNA expression effects of DIF on Tel, Mes, Cer and Med of *C. auratus gibelio*

注：“\*”和“\*\*”表示显著和极显著上调，“Δ”和“ΔΔ”表示显著和极显著下调；同一列小写字母相同表示上调差异不显著，小写字母不同表示上调差异显著或者极显著；同一列大写字母相同表示下调差异不显著，大写字母不同表示下调差异显著或者极显著，（下同）。

“\*" and" \*\*" mean Significant or most Significant up-regulation, while"Δ”and"ΔΔ“mean Significant or most Significant down-regulation. Values with same lowercase letters superscripts in the same column mean no difference (*P*> 0.05), with different lowercase letters superscripts in the same column mean significant difference (*P*<0.05 or *P*<0.01). Values with same capital letters superscripts in the same column mean no difference (*P*> 0.05), with different capital letters superscripts in the same column mean significant difference (*P*<0.05 or *P*<0.01), the same as follow.

#### **4.2.3.2** **DIF**对异育银鲫外周组织**AR**β**2**亚基影响结果

DIF根据前期试验所得到的96 h LD50（2840 mg/kg b. W.）及临床用药剂量上

73

限（20 mg/kg）单次前肠投喂给药，肝脏、肾脏、肌肉三种外周组织中ARβ2亚基表达变化情况见表4-8和表4-9。结果显示：DIF用药后（96h LD50及20 mg/kg）对肝脏、肾脏和肌肉中ARβ2a和ARβ2b mRNA的表达均极显著上调，其中以对肌肉组织中的表达影响最为明显，96 h（LD50）用药剂量下，肌肉组织中ARβ2a和ARβ2b mRNA的表达分别上调1969.299±180.440倍和36513.133±1496.061倍；从

96h LD50及20 mg/kg剂量下对ARβ2a和ARβ2b上调影响幅度来比较，肌肉组织中二者的上调与DIF残留量存在浓度依赖性，即DIF含量越高，对ARβ2a和ARβ2b上调影响越显著；而肝脏、肾脏组织中96 h LD50及20 mg/kg下ARβ2a和ARβ2b的与DIF残留量无关，但是在20 mg/kg剂量下，肝脏、肾脏组织中DIF残留量最大的时间点同时也是ARβ2a和ARβ2b上调幅度最大时间点，说明在一定范围内（低剂量或者推荐用药量下）ARβ2a和ARβ2b的变化与DIF含量成正相关。

表4-8 DIF对异育银鲫肝脏、肾脏及肌肉ARβ2a mRNA表达影响结果

Tab. 4-8 AR*β*2a mRNA expression effects of DIF on liver, kidney and muscle of *C. auratus gibelio*

| 时间点  Time pionts | 肝脏  liver | 肾脏  kidney | 肌肉  muscle |
| --- | --- | --- | --- |
| 96h(LD50) | 39.90±4.58 \*\*a | 20.10±1.45 \*\*a | 1969.30±180.44 \*\*g |
| 0.083h | 69.96±6.74 \*\*e | 5.24±0.45 \*a | 457.17±33.26 \*\*a |
| X h(Max) | 53.44±5.00 \*\*c | 313.13±16.32 \*\*c | 579.09±18.56 \*\*e |
| 120h | 30.24±3.88 \*\*a | 16.93±1.32 \*\*a | 506.51±88.64 \*\*c |

表4-9 DIF对异育银鲫肝脏、肾脏及肌肉ARβ2b mRNA表达影响结果

Tab. 4-9 AR*β*2b mRNA expression effects of DIF on liver, kidney and muscle of *C*. *auratus gibelio*

| 时间点  Time pionts | 肝脏  liver | 肾脏  kidney | 肌肉  muscle |
| --- | --- | --- | --- |
| 96h(LD50) | 1779.58±112.86 \*\*c | 582.09±88.12 \*\*a | 36513.13±496.06 \*\*e |
| 0.083h | 1558.36±91.03 \*\*a | 169.83±12.93 \*\*a | 7486.86±51.48 \*\*a |
| X h(Max) | 2298.92±161.06 \*\*e | 5082.54±450.54 \*\*c | 11619.12±519.44\*\*c |
| 120h | 1539.29±147.72 \*\*a | 382.20±34.16 \*\*a | 7635.81±257.35 \*\*a |

### **4.2.4** **DIF**对异育银鲫**GABA**合成代谢酶影响结果

GABA是脑组织中最重要的神经递质，主要通过与GABAAR结合来实现中枢抑制作用。GABA在体内主要的合成和代谢途径称为GABA支路；GAD和GABA-T是其中与体内GABA含量密切相关的两种酶类。

#### **4.2.4.1** **DIF**对异育银鲫**GAD**影响结果

##### （**1**）**DIF**对异育银鲫大脑**GAD**影响结果

DIF根据上述剂量用药后，采用荧光定量PCR方法首先测定了端脑、中脑、

74

小脑和延脑四个组织中DIF用药后GAD65和GAD67 mRNA表达变化情况。表4-10和表4-11显示：96h LD50 DIF用药条件下，端脑、中脑、小脑、延脑组织中GAD65和GAD67 mRNA的表达上调或者极显著上调；而20 mg/kg用药下，DIF对GAD65和GAD67 mRNA的表达均下调，且GAD65的下调幅度较GAD67的大。由此可以推论：在96h LD50 DIF用药条件下，大脑中的GABA的合成量是增加的，而在20

mg/kg用药下各个时间点GABA的合成减少的。高浓度DIF促进GABA生成，低浓度减少GABA生成。

表4-10 DIF对异育银鲫端脑、中脑、小脑及延脑GAD65 mRNA表达影响结果

Tab. 4-10 GAD65 mRNA expression effects of DIF on Tel, Mes, Cer and Med of *C. auratus gibelio*

| 时间点  Time pionts | 大脑残留  （μg/g）  Brain residual | 端脑（Tel） | 中脑（Mes） | 小脑（Cer） | 延脑（Med） |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 96h(LD50) | 10.49±0 .35 | 1.02±0.14 | 1.08±0.8 \*\* | 2.25±0.16 \*\* | 1.41±0.07 \*\* |
| 0.083h | 0.725±0.022 | 0.25±0.05 ΔΔA | 0.33±0.01 ΔΔA | 0.45±0.03 ΔΔC | 0.35±0.07 ΔΔA |
| X h(Max) | 2.412±0.159 | 0.23±0.02 ΔΔC | 0.21±0.02 ΔΔC | 0.29±0.03 ΔΔA | 0.12±0.01 ΔΔE |
| 120h | 1.530±0.011 | 0.25±0.03 ΔΔA | 0.18±0.01 ΔΔE | 0.29±0.02 ΔΔA | 0.19±0.01 ΔΔC |

表4-11 DIF对异育银鲫端脑、中脑、小脑及延脑GAD67 mRNA表达影响结果

Tab. 4-11 GAD67 mRNA expression effects of DIF on Tel, Mes, Cer and Med of *C. auratus gibelio*

| 时间点  Time pionts | 大脑残留  （μg/g）  Brain residual | 端脑（Tel） | 中脑（Mes） | 小脑（Cer） | 延脑（Med） |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 96h(LD50) | 10.49±0.35 | 2.41±0.09 \*\* | 1.38±0.23 \*\* | 1.79±0.06 \*\* | 1.57±0.11 \*\* |
| 0.083h | 0.725±0.022 | 0.60±0.05 ΔΔC | 0.75±0.02 ΔΔA | 0.74±0.05 ΔΔA | 0.46±0.06 ΔΔA |
| X h(Max) | 2.412±0.159 | 0.75±0.05 ΔΔA | 0.59±0.07 ΔΔC | 0.74±0.05 ΔΔA | 0.22±0.01 ΔΔC |
| 120h | 1.530±0.011 | 0.77±0.07 ΔΔA | 0.45±0.04 ΔΔE | 0.73±0.03 ΔΔA | 0.30±0.01 ΔΔE |

##### （**2**）**DIF**对异育银鲫外周组织**GAD**影响结果

另外，本研究测定了肝脏、肾脏和肌肉等三种外周组织中AVM用药后GAD65和GAD67 mRNA表达变化情况。结果（表4-12可表4-13）显示，在96 h LD50 DIF用药条件下，除肌肉组织GAD65 mRNA的表达下调之外，对外周其他组织（肝脏、肾脏和肌肉）中GAD65和GAD67 mRNA的表达均上调；而20 mg/kg用药下，肌肉组织中的GAD67 mRNA表达上调；另外肾脏组织中的GAD65和GAD67 mRNA表达情况较为特殊，在DIF残留量最高时（27.983±3.521μg/g）极显著上调；其他各用药量及各时间点各组织中GAD65和GAD67 mRNA的表达均下调。

说明在96h LD50 DIF用药条件下，外周组织除肌肉组织中的GABA的含量变化不好判断之外，肝脏、肾脏组织中的GABA的含量是增加的。而在20 mg/kg 用

75

药下，肝脏组织中的GABA的含量是减少的；但肾脏组织中GABA的含量在DIF

残留量最高时（达峰时间12 h，达峰浓度：27.983±3.521μg/g）极显著升高。

表4-12 DIF对异育银鲫肝脏、肾脏及肌肉GAD65 mRNA表达影响结果

Tab. 4-12 GAD65 mRNA expression effects of DIF on liver, kidney and muscle of *C. auratus gibelio*

| 时间点  Time pionts | 肝脏  liver | 肾脏  kidney | 肌肉  muscle |
| --- | --- | --- | --- |
| 96h(LD50) | 1.41±0.07 \*\* | 3.81±0.19 \*\*a | 0.32±0.03 ΔΔC |
| 0.083h | 0.35±0.06 ΔΔA | 0.19±0.05 ΔΔC | 0.04±0.008 ΔΔE |
| X h(Max) | 0.12±0.01 ΔΔC | 13.81±1.06 \*\*c | 0.73±0.08 ΔΔA |
| 120h | 0.19±0.01 ΔΔE | 0.36±0.05 ΔΔA | 0.02±0.002 ΔΔE |

表4-13 DIF对异育银鲫肝脏、肾脏及肌肉GAD67 mRNA表达影响结果

Tab. 4-13 GAD67 mRNA expression effects of DIF on liver, kidney and muscle of *C. auratus gibelio*

| 时间点  Time pionts | 肝脏  liver | 肾脏  kidney | 肌肉  muscle |
| --- | --- | --- | --- |
| 96h(LD50) | 1.57±0.21 \*\* | 8.46±1.43 \*\*c | 14.19±1.25 \*\*g |
| 0.083h | 0.46±0.03 ΔΔA | 0.37±0.08 ΔΔ | 1.59±0.28 \*\*a |
| X h(Max) | 0.22±0.01 ΔΔE | 150.67±12.85 \*\*e | 2.89±0.58 \*\*e |
| 120h | 0.30±0.01 ΔΔC | 3.64±0.28 \*a | 2.10±0.47 \*\*c |

#### **4.2.4.2** **DIF**对异育银鲫**GAB-T**影响结果

DIF根据上述剂量用药后，采用荧光定量PCR方法测定了端脑、中脑、小脑、延脑、肝脏、肾脏及肌肉七种组织中DIF用药后GABA-T mRNA表达变化情况。结果（表4-14和表4-15）显示，在96 h LD50 DIF用药条件下，端脑、中脑、小脑、延脑、肝脏、肾脏和肌肉组织中GABA-T mRNA的表达均极显著上调。结果表明在96 h LD50 DIF用药条件下，上述各组织中GABA的代谢可能是极显著加强的。而上述组织中，只有肝脏在DIF 96 h LD50和临床用药剂量上限（20 mg/kg）的四个时间点上GABA-T mRNA的表达均极显著上调，这也是肝脏作为机体主要代谢器官的一种体现。

表4-14 DIF对异育银鲫端脑、中脑、小脑及延脑GABA-T mRNA表达影响结果

Tab. 4-14 GABA-T mRNA expression effects of DIF on Tel, Mes, Cer and Med of*C. auratus gibelio*

| 时间点  Time pionts | 大脑残留  （μg/g）  Brain residual | 端脑（Tel） | 中脑（Mes） | 小脑（Cer） | 延脑（Med） |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 96h(LD50) | 10.49±0.35 | 1.04±0.16 \*\*a | 1.03±0.11 \*\* | 1.12±0.18 \*\*a | 1.97±0.23 \*\* |
| 0.083h | 0.725±0.022 | 0.80±0.17 ΔΔA | 0.67±0.08 ΔΔA | 0.68±0.05 ΔΔA | 0.57±0.02 ΔΔC |
| X h(Max) | 2.412±0.159 | 0.71±0.06 ΔΔC | 0.37±0.05 ΔΔE | 0.47±0.03 ΔΔC | 0.37±0.03 ΔΔE |
| 120h | 1.530±0.011 | 1.21±0.20 \*\*c | 0.55±0.06 ΔΔC | 1.55±0.14 \*\*c | 0.74±0.02 ΔΔA |

76

表4-15 DIF对异育银鲫肝脏、肾脏及肌肉GABA-T mRNA表达影响结果

Tab. 4-15 GABA-T mRNA expression effects of DIF on liver, kidney and muscle ofC. auratus gibelio

| 时间点  Time pionts | 肝脏  liver | 肾脏  kidney | 肌肉  muscle |
| --- | --- | --- | --- |
| 96h(LD50) | 1.92±0.14 \*\*g | 2.38±0.07 \*\*c | 1.79±0.07 \*\*c |
| 0.083h | 1.15±0.03 \*\*a | 1.02±0.02 \*a | 0.68±0.05 ΔΔC |
| X h(Max) | 1.60±0.20 \*\*c | 5.22±0.22 \*\*e | 1.37±0.14 \*\*a |
| 120h | 1.76±0.18 \*\*e | 0.25±0.01 ΔΔ | 0.93±0.08 ΔΔA |

#### **4.2.4.3** **DIF**对心脏**AR**β**2**及**GABA** Th成代谢酶的影响

结果（表4-15）显示，DIF按照96h LD50剂量用药后，ARβ2a和ARβ2b均极显著上调；其GABA合成的速度变化虽难以判断，但可以明确的是GABA-T表达下调，说明DIF用药后心脏GABA代谢速度发生极显著下降。

表4-15 DIF 96h LD50对异育银鲫心脏AR、GAD和GABA-T mRNA表达影响结果

Tab. 4-15 Effects of DIF on AR, GAD, GABA-T mRNA expression in heart of*C. auratus gibelio*

| 基因  Genes | ARβ2a | ARβ2b | GAD65 | GAD67 | GABA-T |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| DIF 影响  Effects of  DIF | 151.17±11.61 \*\* | 714.71±52.77 \*\* | 0.23±0.09 ΔΔ | 34.38±4.38 \*\* | 0.55±0. 05ΔΔ |

## **4.3** 讨论

### **4.3.1** **DIF**对异育银鲫毒性

目前，关于DIF毒性也有很多研究。张艳等[255]研究表明盐酸二氟沙星混悬乳注射液对小鼠口服LD50为2303.56 mg/kg，对小鼠腹腔注射LD50为723.89 mg/kg，按外源化合物急性毒性分级标准判断为低毒物质。沈川等[256]研究认为双氟沙星在剂量分别为500、50和5 mg/kg时对昆明系小鼠的生殖细胞染色体均未造成损伤，其显性致死试验为阴性。黄文颐[257]等按300、150、50 mg/kg的盐酸二氟沙星给受孕大鼠灌胃，结果高剂量组明显降低胎鼠存活率，显著影响胚胎的生长发育。其严重程度具有剂量效应关系。本文条件下所得到的DIF对体重为60.04±5.02 g异育银鲫96h LD50为2840 mg/kg，按照渔药毒性分级标准判断DIF为低毒物质。

另外，中枢神经系统反应（中枢神经系统毒性）为喹诺酮类药物常见的不良反应。动物表现为不安或神经症状，雏鸡急性中毒神经症状表现为尖叫、旋转、最后头颈及两肢强直、痉挛而死；猫、犬还能诱发癫痫[258]。邓艳萍[148]研究发现，在小鼠脑内注射依诺沙星、环丙沙星、氧氟沙星与司巴沙星等5种氟喹诺酮类抗菌药能引起致惊厥作用。张艳等[255]灌服盐酸二氟沙星混悬乳注射液后各组小鼠均出

77

现扭体、竖尾、全身震颤、抽搐等症状。本文DIF急性毒性试验中，异育银鲫在用药后第16h开始表现急躁不安，呼吸频率加快且不规则，快速游动并上浮；第49 h左右体态出现侧翻呈弯月形，焦躁不安，极速游动，在水中呈“头上尾下”异常体态等，随着用药时间的增加，有些异育银鲫表现腹部朝上等异常体态，同时胸鳍和臀鳍呈僵直、震颤等类似神经异常症状。DIF急性毒性试验的临床症状表明DIF对异育银鲫具有神经毒性。这可能是由于FQs药物含有氟原子（使其亲脂性增加，组织渗透力增强），容易通过血-脑屏障进入脑组织及神经细胞内，使γ-氨基丁酸释放减少，另外FQs能竞争性抑制GABA与突触后受体的结合，使CNS兴奋性增高

[259]。

### **4.3.2** **DIF**血脑屏障渗透性

目前，关于药物透过机体屏障方面已有大量研究。血乳屏障研究上，在克罗

地亚，从初乳中检测出了包括阿莫西林在内的多种兽药[239]。Escudero等[240（]

2011)

从哺乳ft羊的乳中检测到双氟沙星表明其能透过血乳屏障。Hoy等[241]（1990）研究表明双氟沙星能透过血睾屏障而产生毒性效应。而在血脑屏障研究上，丁明玉等[238]（2000）采用反相高效液相色谱法测定了实验动物脑匀浆中的川芎嗪，说明川芎嗪能够透过血脑屏障。大鼠动脉灌注培氟沙星、诺氟沙星、环丙沙星、氟罗沙星和司帕沙星等氟喹诺酮类药物后，在其大脑组织中可以检测到相应药物的存在[260]。另外，在体外也有关于FQs透过血脑屏障的研究[261]。

目前，还未见有关于DIF是否能通过鱼类血脑屏障进入其大脑组织的报道。而用于药物BBB通透性的评价方法主要有体内评价、体外评价以及数学模型等方法，其中体内评价方法主要是测定实验动物脑组织及脑脊液中的药物成分，脑组织匀浆法是考察药物BBB通透性的体内评价方法之一[237]。本文采用脑组织匀浆法，测定了6 h LD50及临床推荐用药剂量下，异育银鲫大脑组织中DIF存在与否。结果显示，在96 h LD50剂量（2840 mg/kg b. W.）下，大脑组织中DIF含量为10.49±0.35μg/g，说明DIF能透过异育银鲫血脑屏障进入大脑组织；而作为机体主要排泄器官，肾脏中DIF含量最小，仅为4.33±0.35μg/g。这可能是由于在体内，DIF能被代谢为沙拉沙星而以DIF原型及其代谢产物（SAR）等两种形式排泄出体外[171, 173]，因而在肾脏组织中DIF残留量最少。另外，在临床推荐用药剂量（20 mg/kg）下的不同时间点均能从异育银鲫大脑组织中检测到DIF存在，表明低剂量的DIF也能透过异育银鲫血脑屏障。另一方面，大脑组织在达峰时间（12 h）最长、达峰浓度（2.410μg/g）最小，这可能正是因为血脑屏障的存在而引起的。

78

DIF血脑屏障通透性一方面预示DIF可以应用于异育银鲫或其他水产动物脑部疾病的治疗上，另一方面也提示在临床使用DIF的时候应考虑其中潜在的风险

（例如神经毒性）。邓艳萍[148]研究发现，在小鼠脑内注射依诺沙星、环丙沙星、氧氟沙星与司巴沙星等5种氟喹诺酮类抗菌药能引起致惊厥作用。本文中异育银鲫大脑组织中DIF的检出，可以认为是研究其是否具有神经毒性的物质基础，甚至是证明其具有神经毒性的有力佐证。有研究表明，强力霉素作为一种半合成的四环素类抗生素，因其脂溶性高而容易透过血脑屏障[244]。氟喹诺酮类药物分子结构中第6位碳原子上有疏水性的氟原子，因此，该类药物具有一定的脂溶性，能较好地透过血脑屏障进大脑组织。目前，对于DIF进入异育银鲫大脑组织的机制尚不清楚，这可能与其脂溶性有关。

### **4.3.3** **DIF**组织消除规律比较

通常将残留量高、消除最慢的组织看成是残留分析的靶组织。李海迪等[262]在对双氟沙星及其代谢产物在中华绒螯蟹体内药动学的研究中发现，DIF组织残留高低顺序为：肝胰腺>卵巢>肌肉≈血淋巴>精巢，认为肝胰腺中药物残留最高，消除最缓慢，因此可作为残留分析的靶组织。本文中，DIF按照20 mg/kg采取单次前肠投喂给药后，大脑及外周组织DIF消除过程见图4-3。结果显示，四种组织中，以大脑组织中的DIF消除过程最为平缓；虽然达峰浓度（*C*max）大脑组织最小，但是到试验最后5个时间点时，各组织中DIF含量接近（表4-5），且在试验第960

h，大脑组织中DIF含量最高，为0.392±0.007μg/g；另外，大脑组织中DIF消除半衰期（*T*1/2β）最长1157.713 h，因此，异育银鲫大脑组织可作为DIF药物残留分析的靶组织。

有研究表明，肝、肾组织中FQs残留物浓度最高，其次是肌肉和有脂肪附着的皮肤组织[156]。而本研究中，不管是在96 h LD50剂量还是在临床推荐用药剂量下，

DIF在异育银鲫的肝脏、肾脏及肌肉组织中存在类似残留特性（表4-4, 图4-3）。

DIF最大残留限量（MRL）方面，欧盟（EU, 2003）规定：在肝脏中的最大残留限量为800μg/kg，在肾脏中的最大残留限量为600μg/kg，在肌肉中最大残留限量为300μg/kg。本试验结果显示，在临床推荐用药剂量（20 mg/kg）下，肝脏、肾脏、肌肉分别于给药后第336 h（0.751±0.123μg/g）、第480h（0.537±0.071μg/g）、第600 h（0.283±0.011μg/g）时达到欧盟（EU, 2003）规定要求。丁俊仁等[263]研究强力霉素在斑点叉尾鮰体内的药物动力学与消除规律时也发现，若以肝脏为靶组织，休药期不低于30d；若以可食组织肌肉+皮为靶组织，休药期不低于19 d。因此，在本实验条件下，以主要可食组织肌肉的残留为主要参考指标，设定DIF

79

休药期至少为25 d，这与李海迪等建议DIF在中华绒螯中的休药期应大于24 d基本一致。

### **4.3.4** **DIF**对异育银鲫的神经毒性研究

有研究认为，FQs药物的毒性主要有中枢神经毒性、肝肾毒性、心脏毒性、胃肠道毒性、软骨毒性、生殖毒性等[144]。中枢神经毒性方面，氟喹诺酮类药物导致的中枢神经系统反应主要表现为情绪不安、头昏、眩晕、失眠等，易诱发癫痫，严重的神经毒性反应可产生幻觉、抑郁等神经疾病反应[145, 146]。研究表明，FQs药物神经毒性与其能竞争性抑制神经递质GABA与GABA受体结合有关。FQs能竞争性抑制神经递质GABA与GABA受体结合，从而提高神经的兴奋性[158-160]。一般认为FQs分子中氟原子使其亲脂性增加，其组织渗透能力增强，容易通过血脑屏障进入脑组织及神经细胞内。FQs在脑脊液中的浓度增高，使得GABA从自主神经末梢释放减少的同时，还可以竞争性抑制GABA与突触后受体结合，使CNS兴奋性增加，导致惊厥和癫痫等不良反应的发生[157]。药理研究发现，FQs例如环丙沙星、依诺沙星和诺氟沙星等能够抑制啮齿类动物大脑突触后放射配体与GABAA受体的结合

[155]. 上述研究均是围绕FQs药物作为GABA竞争性拮抗剂的角度展开的。而在药

物对受体数量影响方面，张蓉等[249]利用游泳方式建立了大鼠的运动性疲劳动物模型，用荧光定量PCR技术测得小鼠海马部位和纹状体部位GABAARα1 mRNA表达升高；同时还发现模型组小鼠在采用疏肝方剂四逆散、健脾方剂四君子汤干等中药制剂预之后，海马及纹状体部位的GABAARα1 mRNA表达水平下降，而补肾方剂金匮肾气丸则对受体mRNA的调节作用不明显。另外有研究表明经氯丙嗪处理的热应激组小鼠大脑皮层中的GABAA受体和GABAB受体两类受体增多出现上调现象[248]。结果表明药物对机体内受体的含量产生了影响。本文中，DIF在96h LD50及20 mg/kg用药条件下，端脑、中脑、小脑、延脑组织中的ARβ2a mRNA的表达均极显著下调；对ARβ2b mRNA的表达除了20 mg/kg用药条件下延脑的表达下调之外，端脑、中脑、小脑中的表达均上调。而在外周组织中，肝脏、肾脏和肌肉中

ARβ2a和ARβ2b mRNA表达均极显著上调，其中以对肌肉组织中的表达影响最为明显。结果表明DIF能使异育银鲫体内ARs的数量发生变化。

关于FQs神经毒性的报道不少，但是其中对FQs引起神经毒性机制的研究不多。邓艳萍[148]曾经在小鼠上开展过氟喹诺酮类药物对其中枢神经毒性及其机制研究，但目前为止还未见有在鱼类上开展类似的报道。本文DIF急性毒性试验中，异育银鲫出现焦躁不安，极速游动，有些异育银鲫胸鳍和臀鳍呈僵直、震颤等类似神经兴奋症状，表明对异育银鲫中枢神经系统产生了毒性。而DIF在96 h LD50

80

及20 mg/kg用药条件下，端脑组织中ARβ2a mRNA的表达虽然表现极显著下调但是其ARβ2b mRNA的表达情况恰恰相反；因为端脑为鱼类的高级运动中枢，因此可以推论异育银鲫中毒后出现的僵直、震颤等类似神经兴奋症状有可能是由于DIF引起端脑ARβ2b mRNA的上调所致。另外，DIF在96 h LD50及20 mg/kg用药条件下肌肉组织中ARβ2a和ARβ2b mRNA表达均极显著上调可能是造成异育银鲫中毒后出现的僵直、震颤等症状的另一原因。

氟喹诺酮类药物可抑制中枢神经介质GABA与受体结合，产生中枢兴奋作用。有文献研究报道，FQs致痫机制是阻止GABA与神经细胞相应的受体结合，而致脑神经细胞的兴奋抑制调节失调[158-160]。因此，内源性GABA含量发生变化就有可能对FQs所致的中枢兴奋作用产生影响。一般认为FQs分子中氟原子使其亲脂性增加，其组织渗透能力增强，容易通过血脑屏障进入脑组织及神经细胞内，FQs在脑脊液中的浓度增高，使得神经末梢自主减少GABA释放的同时，还可以竞争性抑制GABA与突触后受体结合，使CNS兴奋性增高，引发惊厥和癫痫等不良反应[157]。。邓艳萍[148]的研究同样认为在氟喹诺酮类药物刺激下，小鼠中枢神经系统中抑制性神经递质GABA释放量减少，GABA与ARs结合量下降，诱发惊厥。但是，周义文等[161]研究发现环丙沙星能改变中枢神经系统内兴奋氨基酸及抑制氨基酸的代谢平衡，使抑制性氨基酸GABA含量增大。本文中，DIF在96 h LD50用药条件下，异育银鲫端脑、中脑、小脑、延脑组织中的GAD（GAD65和GAD67）及GABA-T mRNA的表达均极显著上调。结果表明在96 h LD50用药条件下，DIF促使异育银鲫中枢神经系统中GABA的合成及代谢加速，但是其含量是否发生变化即是否促进或者抑制GABA的释放还难以判断。

综上，DIF引起异育银鲫神经毒性的机制可能是通过对ARβ2b实现的。另外，

DIF用药后对异育银鲫体内GAD、GABA-T产生了影响，但是否会引起体内GABA含量发生变化，单从DIF对GAD、GABA-T基因的mRNA表达水平变化上难以推论。

### **4.3.5** **DIF**对异育银鲫的心脏毒性研究

有研究认为，FQs药物的毒性主要有中枢神经毒性、肝肾毒性、心脏毒性、胃肠道毒性、软骨毒性、生殖毒性等[144]。有研究表明，氟喹诺酮类药物诱发尖端扭转性室速（TdP）概率依次为司帕沙星>格帕沙星>加替沙星>左氧氟沙星>氧氟沙星>环丙沙星[150, 151]。Chiha等[152]运用完全性房室传导阻滞、心室自身心律模型进行心律失常研究表明，司帕沙星较左氧氟沙星致心律失常作用大，并呈剂量依赖性。本文中，DIF按照96 h LD50剂量用药后，ARβ2a和ARβ2b基因的表达均出

81

现了极显著上调。结果表明，FQs引发心脏毒性可能与其引起ARβ2发生变化有关。

## **4.4** 小结

# 1、 本试验条件下，不同剂量的DIF均能引起异育银鲫体内的ARβ2a、ARβ2b基因的表达发生变化，并且推测DIF导致异育银鲫产生神经毒性的机制可能是通过引起ARβ2b表达上调实现的；

# 2、 有研究认为FQs可以减少神经末梢GABA的自主释放，但也有研究认为环丙沙星能促进体内GABA含量的增加。而本文认为，DIF用药后会对异育银鲫体内

GAD、GABA-T产生影响，但单从DIF对GAD、GABA-T基因的mRNA表达水平变化上难以对体内GABA含量发生变化进行推论；

# 3、 本文中在不同剂量及不同时间点均能在异育银鲫大脑中检测到DIF残留，表明

DIF能渗透通过异育银鲫的血脑屏障，其通过BBB的原因可能是由于FQs药物含有氟原子因而具有一定脂溶性性质有关；

# 4、 从大脑、肝脏、肾脏及肌肉四个组织中DIF的消除规律来看，异育银鲫大脑组织可作为DIF药物残留分析的靶组织。

82

## 全文结 论

**一、异育银鲫体内有ARβ2、GAD及GABA-T的存在和广泛分布**

ARβ2（a、b亚型）、GAD及GABA-T在异育银鲫中枢神经系统的端脑、中脑、小脑、延脑和外周神经组织的肝脏、肾脏、心脏、肠道、鳔、鳃、肌肉及鳍条等

12组织中均有分布，且上述基因均主要在异育银鲫中枢神经系统中分布。另外，

ARβ2、GAD及GABA-T在组织中的表达会受到发育阶段的影响。

**二、AVM、DIF能透过异育银鲫血脑屏障进入其大脑组织**

不同浓度或者剂量的AVM、DIF在本论文的试验时间点上均能在异育银鲫大脑组织中检测到，说明AVM、DI能F透过了鱼类的血脑屏障；同时二者在异育银鲫大脑中的存在为解释二者具有神经毒性找到了药物基础。

**三、基于GABAA受体的研究结果表明鱼类ARs会受到渔药的影响**

绝大多数情况下，AVM、DIF用药后对异育银鲫体内ARβ2的表达产生下调影响；并且认为AVM用药后产生的呼吸抑制可能与AVM极显著下调其延脑（鱼类呼吸中枢）ARβ2a和ARβ2b mRNA表达有关，而DIF导致异育银鲫产生神经毒性的机制可能是通过对ARβ2b来实现的。

**四、基于GABAA受体的研究结果表明鱼类GAD及GABA-T会受到渔药的影响**之前有研究认为AVM促进体内GABA的释放，DIF能抑制或者促进GABA的释

放，本研究认为AVM、DIF用药后对异育银鲫体内GAD及GABA-T确能产生影响，但本文二者对GAD及GABA-T所产生的影响来看，难以对机体内GABA含量变化加以判断。

**本论文分析了ARs在异育银鲫体内的分布情况，研究了AVM、DIF引起鱼类产生神经症状的原因及可能的机理，为从受体的角度为探究渔药对鱼类特别是对鱼类中枢神经系统的影响作了初步的探索。**

83

## 创新 点

**一、系统地分析了鱼类体内受体的分布情况**

运用TR-PCR和qRT-PCR方法对异育银鲫体内不同组织ARs分布情况进行了定性和定量分析，并发现受体主要分布于异育银鲫的中枢神经系统中，这一研究结果与之前关于受体主要在中枢神经系统中分布结论一致。

**二、对渔药引起鱼类神经毒性的原因及可能的机理进行了探究**

从渔药急性毒性、渔药组织残留特别是在脑部残留以及渔药用药后对受体影响，并结合给药后的临床症状对AVM、DIF引起鱼类神经毒性的原因及可能的机理进行综合分析和探讨。

84

参 考 文 献

[1] Barnard E A, Skolnick P, Olsen R W, et al. International Union of Pharmacology.

XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function [J]. Pharmacol Rev, 1998, 50 (2):291-313.

[2] Olsen R W, Sieghart W. International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid (A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update [J]. Pharmacol Rev, 2008, 60(3):243-260.

[3] Rudolph U, Crestani F, Möhler H. GABA A receptor subtypes: dissecting their pharmacological functions [J]. Trends in Pharmacological Sciences, 2001, 22 (4):188-194.

[4]史婧. γ-氨基丁酸、γ-氨基丁酸受体、γ-氨基丁酸受体基因在脑梗死中的作用[J].

包头医学, 2011,35(1):3-6 .

[5] McKernan R M, Whiting P J. Which GABAA-receptor subtypes really occur in the brain[J]. TrendsinNeurosciences, 1996, 19(4):139-143.

[6] Jackel C, Kleinz R, MäkeläR, et al. The main determinant of furosemide inhibition on GABAA receptors is located close to the first transmembrane domain [J]. European Journal of Pharmacology, 1998, 357(2–3):251-256.

[7] Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler A, et al. GABAA receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain [J]. Neuroscience, 2000, 101(4):815-850.

[8] Lüscher B, Keller C A. Regulation of GABA A receptor trafficking, channel activity, and functional plasticity of inhibitory synapses [J]. Pharmacology &amp; Therapeutics, 2004, 102(3):195-221.

[9]付立志， 徐进宜， 吴晓明， 等. γ-氨基丁酸受体及相关药物研究进展[J]. 中国

医疗前沿, 2007(08):35-37.

[10] Erdo S L. Strychnine protection against excitotoxic cell death in primary cultures of rat cerebral cortex [J]. Neurosci Lett, 1990, 115(2-3):341-344.

[11] ROBERTS E, FRANKEL S. gamma-Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid [J]. J Biol Chem, 1950, 187(1):55-63.

[12] Christensen HN G A K D. Special transport and neurological significance of two amino acids in a configuration conventionally designated as D. [J]. J Exp Biol., 1994(196):297-305.

85

[13]吴茂盛，冼超. 重型肝炎昏迷患者血浆γ-氨基丁酸检测的临床意义[J]. 肝脏病杂志, 1995, 3(3)：179-180.

[14] Shelp B J, Bown A W, McLean M D. Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid[J]. Trends in Plant Science, 1999, 4(11):446-452.

[15] Chung I, Bown A W, Shelp B J. The production and efflux of 4-aminobutyrate in isolated mesophyll cells [J]. Plant Physiol, 1992, 99(2):659-664.

[16] Fougere F, Le Rudulier D, Streeter J G. Effects of Salt Stress on Amino Acid, Organic Acid, and Carbohydrate Composition of Roots, Bacteroids, and Cytosol of Alfalfa (Medicago sativa L.)[J]. Plant Physiol, 1991, 96(4):1228-1236.

[17] Farrant M, Kaila K. The cellular, molecular and ionic basis of GABAA receptor signaling[J]. Progress in Brain Research, 2007, 160:59-87.

[18] Martin D L, Rimvall K. Regulation of gamma-aminobutyric acid synthesis in the brain [J]. J Neurochem, 1993, 60(2):395-407.

[19] Martin D L, Barke K E. Are GAD65 and GAD67 associated with specific pools of GABA in brain[J]. PerspectDevNeurobiol, 1998, 5(2-3):119-129.

[20] Belhage B, Hansen G H, Elster L, et al. Effects of gamma-aminobutyric acid (GABA) on synaptogenesis and synaptic function [J]. Perspect Dev Neurobiol, 1998, 5(2-3):235-246.

[21] Eshaq R S, Stahl L D, Stone II R, et al. GABA acts as a ligand chaperone in the early secretory pathway to promote cell surface expression of GABAA receptors [J]. Brain Research, 2010, 1346(0):1-13.

[22] Nutt D, Argyropoulos S, Hood S, et al. Generalized anxiety disorder: A comorbid disease [J]. European Neuropsychopharmacology, 2006, 16, Supplement 2(0):S109-S118.

[23] Wood J D, Kurylo E, Newstead J D. Aminooxyacetic acid induced changes in gamma-aminobutyrate metabolism at the subcellular level[J]. Can J Biochem, 1978, 56(6):667-672.

[24] Sherwin A L. Neuroactive amino acids in focally epileptic human brain: a review[J]. Neurochem Res, 1999, 24(11):1387-1395.

[25] Roberts E, Frankel S. gamma-Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid [J]. J Biol Chem, 1950, 187(1):55-63.

[26] Awapara J, Landua A J, Fuerst R, et al. Free gamma-aminobutyric acid in brain[J].

J Biol Chem, 1950, 187(1):35-39.

[27]吴飞健，吴政星，陈其才. GABA:一种重要的中枢抑制性神经递质[J]. 高等函授学报（自然科学版）, 1997(01)： 4-8.

[28]张力，张士善. 外周GABA受体研究进展[J]. 中国药理学通报, 1990,6(3): 143-146.

86

[29] Li K, Xu E. The role and the mechanism of gamma-aminobutyric acid during central nervous system development [J]. Neurosci Bull, 2008, 24(3):195-200.

[30]张祥， 乔健. 脑脊液中氨基酸分析与中枢神经系统疾病关系[J]. 国外医学（临

床生物化学与检验学分册）, 2002,23(6): 357-358, 361.

[31]王擒云，杨建平，戴体俊，等. GABAA受体部分介导丙泊酚在中脑导水管周围灰质腹外侧区的致痛觉过敏作用[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(2)：175-180.

[32]郑红发，黄亚辉，刘霞林，等. γ-氨基丁酸的药理作用[J]. 茶叶通讯, 2004(4)：14-18.

[33]范少光， 屈智超. 脑内γ-氨基丁酸能神经及其功能[J]. 生理科学进展，

1984(01): 41-45.

[34]任艳红， 赵堪兴. γ-氨基丁酸A受体α1亚单位在正常发育大鼠视皮层中的表达

[J]. 眼科研究, 2010,28(8): 703-706.

[35] Krajnc D, Norton H N, Hadjiconstantinou M. Glutamate, glutamine and glutamine synthetase in the neonatal rat brain following hypoxia [J]. Brain Research, 1996, 707(1):134-137.

[36] Hashimoto K. The role of glutamate on the action of antidepressants[J]. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 2011, 35(7):1558-1568.

[37] Puente M A, Tartaglione C M, Ritta M N. Bull sperm acrosome reaction induced by gamma-aminobutyric acid (GABA) is mediated by GABAergic receptors type A [J]. Animal Reproduction Science, 2011, 127(1–2):31-37.

[38]林亲录， 王婧， 陈海军. γ-氨基丁酸的研究进展[J]. 现代食品科技 ,

2008,24(5):496-500.

[39] Kalia V, Fenske C, Hole D R, et al. Effect of gonadal steroids and gamma-aminobutyric acid on LH release and dopamine expression and activity in the zona incerta in rats[J]. J Reprod Fertil, 1999,117(1):189-197.

[40]赵彤， 王福庄， 黄燕华， 等. GABA对大鼠海马脑片缺氧损伤的保护作用[J].

中国应用生理学杂志, 2003(01): 17-20.

[41]魏智清，杨涓，赵红雪，等. 牛磺酸、γ-氨基丁酸对鲫抗缺氧能力的影响[J]. 淡水渔业, 2006, 36(1)：7-10.

[42] Fraser E J, Bosma P T, Trudeau V L, et al. The Effect of Water Temperature on the GABAergic and Reproductive Systems in Female and Male Goldfish (Carassius auratus)[J]. General and Comparative Endocrinology, 2002, 125(2):163-175.

[43]杨藻宸. 药理学和药物治疗[M]. 北京：人民卫生出版社, 2000。

[44] Hayakawa K, Kimura M, Kasaha K, et al. Effect of a gamma-aminobutyric acid-enriched dairy product on the blood pressure of spontaneously hypertensive

87

And normotensive Wistar-Kyoto rats[J]. Br J Nutr, 2004, 92(3):411-417.

[45]张辉，徐满英. 荷包牡丹碱对抗GABA对大鼠束旁核痛兴奋神经元电活动的影响[J]. 中国疼痛医学杂志, 2007, 13(2)：92-95.

[46]尤浩军，孙红卫. GABA在致痫中的基础与临床[J]. 国外医学：神经病学．神经外科学分册, 1998, 25(4)：171-174.

[47]和姬苓. γ-氨基丁酸B型受体基因与癫痫关系研究进展[J]. 包头医学院学报, 2011, 27(5)：112-113.

[48]徐传伟， 夏应和. γ-氨基丁酸控制哮喘急性发作临床疗效观察[J]. 滨州医学院

学报, 1999,22(2):181.

[49] DeFeudis F V. gamma-Aminobutyric acid and cardiovascular function [J].

Experientia, 1983, 39(8):845-849.

[50] Segal S A, Jacob T, Gillis R A. Blockade of central nervous system GABAergic tone causes sympathetic-mediated increases in coronary vascular resistance in cats[J]. Circ Res, 1984, 55(3):404-415.

[51]李静， 李霞. γ-氮基丁酸在畜牧生产上的应用[J]. 中国饲料, 2010(3)：12-16.

[52]李爱学. γ-氨基丁酸和氟安定对产蛋高峰期母鸡摄食行为及有关内分泌的影响

[D]. 南京农业大学, 2003.

[53] Abdou A M, Higashiguchi S, Horie K, et al. Relaxation and immunity enhancement effects of gamma-aminobutyric acid (GABA) administration in humans[J]. Biofactors, 2006, 26(3):201-208.

[54]甘平， 杨茹， 程介士. GABA受体在脑缺血中的作用[J]. 中国神经科学杂志，

2004,20(1): 78-81.

[55]郭莲军. GABAA受体与脑缺血[J]. 咸宁学院学报：医学版, 2004,18(2):7 7-80. [56]Shuaib A, Ijaz M S, Miyashita H, et al. GABA and Glutamate Levels in the

Substantia Nigra Reticulata Following Repetitive Cerebral Ischemia in Gerbils[J]. Experimental Neurology, 1997, 147(2):311-315.

[57] Gabriel E M, Inglefield J R, Chadwick L E, et al. Ischemic injury and extracellular amino acid accumulation in hippocampal area CA1 are not dependent upon an intact septo-hippocampal pathway [J]. Brain Research, 1998, 785(2):279-286.

[58]张勇， 史明， 等. 急性脑梗死患者血清中抑制性氨基酸递质的变化[J]. ft东医

药, 2002,42(14): 6-8.

[59]秦旺华，李芳序，张志坚，等. 龟脑的强抗氧化功能可能与龟类的长寿相关[J]. 生命科学研究, 2004, 8(1)：8-10.

[60]陈忠，王婷，黄丽明，等. GABA对热应激仔鸡的影响[J]. 动物学研究, 2002,23(4): 341-344.

88

[61]吕宝璋， 田英. 受体学概论[M]. 北京：科学出版社, 1991。

[62] Zhang G, Raol Y H, Hsu F C, et al. Effects of status epilepticus on hippocampal GABAA receptors are age-dependent[J]. Neuroscience, 2004, 125(2):299-303.

[63] Lester H A, Dibas M I, Dahan D S, et al. Cys-loop receptors: new twists and turns [J]. Trends in Neurosciences, 2004, 27(6):329-336.

[64] Werner S. Unraveling the function of GABAA receptor subtypes [J]. Trends in Pharmacological Sciences, 2000, 21(11):411-413.

[65] Barnard E A. Finding a path through the forest of the GABAA receptors [J].

European Neuropsychopharmacology, 1998, 8, Supplement 2(0):S53.

[66] Rudolph U, Mohler H. GABA-based therapeutic approaches: GABAA receptor subtype functions [J]. Curr Opin Pharmacol, 2006, 6(1):18-23.

[67] Lüddens H, Korpi E R. Biological function of GABA A/benzodiazepine receptor heterogeneity [J]. Journal of Psychiatric Research, 1995, 29(2):77-94.

[68] Rudolph U, Möhler H. GABA -based therapeutic approaches: GABAA receptor subtype functions [J]. Current Opinion in Pharmacology, 2006, 6(1):18-23.

[69] Rosahl T W. Validation of GABA (A) receptor subtypes as potential drug targets by using genetically modified mice [J]. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord, 2003, 2(4):207-212.

[70] Nelson R M, Green A R, Lambert D G, et al. On the regulation of ischaemia-induced glutamate efflux from rat cortex by GABA; *in vitro* studies with GABA, clomethiazole and pentobarbitone [J]. Br J Pharmacol, 2000, 130(5):1124-1130.

[71]陆晴友， 王秋根， 张秋林， 等. 脑性瘫痪幼鼠脑谷氨酸脱羧酶、γ-氨基丁酸A受

体表达的变化[J]. 中国临床康复, 2004,8(3): 484-485.

[72] Green A R, Hainsworth A H, Jackson D M. GABA potentiation: a logical pharmacological approach for the treatment of acute ischaemic stroke [J]. Neuropharmacology, 2000, 39(9):1483-1494.

[73]何晓兵， 严缘昌. γ-氨基丁酸B型受体(GABA\_BR)研究最新进展[J]. 细胞生物

学杂志, 2002(04): 217-223.

[74] Le Corronc H, Alix P, Hue B. Differential sensitivity of two insect GABA-gated chloride channels to dieldrin, fipronil and picrotoxinin[J]. J Insect Physiol, 2002, 48(4):419-431.

[75] Vacher C M, Bettler B. GABA (B) receptors as potential therapeutic targets [J].

Curr Drug Targets CNS Neurol Disord, 2003, 2(4):248-259.

[76] Cromer B A, Morton C J, Parker M W. Corrigendum: Anxiety over GABAA receptor structure relieved by AChBP [J]. Trends in Biochemical Sciences, 2002, 27(7):380.

89

[77] Johnston G A, Chebib M, Hanrahan J R, et al. GABA(C) receptors as drug targets [J]. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord, 2003, 2(4):260-268.

[78]黄云峻， 宋兆立. γ-氨基丁酸受体的神经化学研究新进展[J]. 国外医药：合成

药．生化药．制剂分册, 1996,17(3): 139-141.

[79] Tanelian D L, Kosek P, Mody I, et al. The role of the GABAA receptor/chloride channel complex in anesthesia[J]. Anesthesiology, 1993, 78(4):757-776.

[80] Sousa A, Ticku M K. Interactions of the neurosteroid dehydroepiandrosterone sulfate with the GABA (A) receptor complex reveals that it may act via the picrotoxin site[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1997, 282(2):827-833.

[81]郑虹， 秦学玲， 等. 原位杂交定位检测大鼠前庭末梢γ-氨基丁酸A受体亚单位

α2mRNA[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志, 2001,36(3): 190-192.

[82] Tsang S Y, Xue H. Development of effective therapeutics targeting the GABAA receptor: naturally occurring alternatives [J]. Curr Pharm Des, 2004, 10(9):1035-1044.

[83] Weiner J L, Valenzuela C F. Ethanol modulation of GABAergic transmission: the view from the slice [J]. Pharmacol Ther, 2006, 111(3):533-554.

[84] Buggy D J, Nicol B, Rowbotham D J, et al. Effects of intravenous anesthetic agents on glutamate release: a role for GABAA receptor-mediated inhibition [J]. Anesthesiology, 2000, 92(4):1067-1073.

[85] McKellar Q A, Benchaoui H A. Avermectins and milbemycins [J]. J Vet Pharmacol Ther, 1996, 19(5):331-351.

[86] Horsberg T E. Avermectin use in aquaculture [J]. Curr Pharm Biotechnol, 2012, 13(6):1095-1102.

[87]张明月， 齐秀英， 张静， 等. 阿维菌素原药诱导大鼠肝组织热应激蛋白70基因

表达的研究[J]. 环境与健康杂志, 2008(03): 218-220.

[88]李术，崔雅莉，王敏，等. 阿维菌素对体外培养王鸽脑神经细胞凋亡和一氧化氮水平的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2010, 41(3)：347-352.

[89]卢文才，何林，薛传华，等. 昆虫γ-氨基丁酸受体研究现状[J]. 昆虫知识, 2009(1)：152-158.

[90]扈洪波， 朱蓓蕾， 等. 阿维菌素类药物的研究进展[J]. 畜牧兽医学报，

2000,31(6): 520-529.

[91]徐颖，陈淑芬，姜红，等. 阿维菌素原药对大鼠脑细胞毒性的初步研究[J]. 毒理学杂志, 2010, 24(3)：226-228.

[92] Yuri M. Kokoz, Vera G. Tsyganova, Antonina F. Korystova, et al. Selective Cytostatic and Neurotoxic Effects of Avermectins and Activation of the GABAa Receptor[J]. Bioscience Reports, 1999, 6(19):535-546.

90

[93]崔雅莉，王敏，黄蔚，等. 线粒体损伤在阿维菌素致体外培养神经细胞凋亡中的作用[J]. 中国兽医科学, 2007, 37(11)：969-973.

[94]李术，沈建忠，徐世文. 阿维菌素对鸽半数致死浓度的试验[J]. 中国兽医科技, 2003, 33(6)：48-50.

[95]周帅， 房文红， 吴淑勤. 渔用阿维菌素水乳剂的安全性和药效评价[J]. 上海海

洋大学学报, 2009(3): 327-331.

[96]徐文彦， 郭国军， 齐子鑫， 等. 阿维菌素和甲苯咪唑对黄河鲤的急性毒性研究

[J]. 淡水渔业, 2011,41(2): 88-91.

[97]邴欣，汝少国，周文礼，等. 阿维菌素的环境雌激素活性和生殖毒性评价[J]. 武汉大学学报：理学版, 2008, 54(6)：745-750.

[98]王锡珍，陆宏达. 阿维菌素对几种淡水水生动物的急性毒性作用[J]. 环境与健康杂志, 2009(7)：593-597.

[99]杨卫超，徐颖，姜红，等. 实验动物体重与阿维菌素急性毒性反应关系研究[J]. 中华医学与健康，2006, 3(8)：50。

[100]朱九生，连梅力，王静，等. 阿维菌素对广赤眼蜂（Trichogramma evanescens）不同发育阶段的毒性和实验种群动态的影响[J].生态学报, 2009,29(9):4738-4744.

[101]张振玲， 史岩， 张树来， 等. 阿维菌素制剂的毒性作用[J]. 卫生毒理学杂志，

2003,17(2): 114-116.

[102] Christensen F M. Pharmaceuticals in the environment--a human risk[J]. RegulToxicolPharmacol, 1998, 28(3):212-221.

[103] Hirsch R, Ternes T, Haberer K, et al. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment[J]. Sci Total Environ, 1999, 225(1-2):109-118.

[104] Strong L, Wall R, Woolford A, et al. The effect of faecally excreted ivermectin and fenbendazole on the insect colonisation of cattle dung following the oral administration of sustained-release boluses[J]. Vet Parasitol, 1996, 62(3-4):253-266.

[105] Strong L. Overview: the impact of avermectins on pastureland ecology [J]. Vet Parasitol, 1993, 48(1-4):3-17.

[106]陈杖榴， 杨桂香， 孙永学， 等. 兽药残留的毒性与生态毒理研究进展[J]. 华南

农业大学学报, 2001(01): 88-91.

[107] Cerniglia C E, Kotarski S. Evaluation of veterinary drug residues in food for their potential to affect human intestinal microflora[J]. Regul Toxicol Pharmacol, 1999, 29(3):238-261.

[108]吴强恩。 甲胺基阿维菌素的毒理学研究概况[J]. 中国公共卫生 ,

91

2003(09):111-113.

[109] Herd R. Endectocidal drugs: ecological risks and counter-measures [J]. Int J Parasitol, 1995, 25(8):875-885.

[110] Elbetieha A, Da'As S I. Assessment of antifertility activities of abamectin pesticide in male rats [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2003, 55(3):307-313.

[111]桂莉， 田洪， 郑健， 等. 高效液相色谱荧光法同时测定小鼠脑组织中4种氨基

酸类神经递质[J]. 第三军医大学学报, 2009(08): 675-678.

[112] Kehoe J, Buldakova S, Acher F, et al. Aplysia cys-loop glutamate-gated chloride channels reveal convergent evolution of ligand specificity[J]. J Mol Evol, 2009, 69(2):125-141.

[113] Lasota J A, Dybas R A. Avermectins, a novel class of compounds: implications for use in arthropod pest control [J]. Annu Rev Entomol, 1991, 36:91-117.

[114] Wolstenholme A J, Rogers A T. Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics[J]. Parasitology, 2005,131 Suppl: S85-S95.

[115] Shan Q, Haddrill J L, Lynch J W. Ivermectin, an unconventional agonist of the glycine receptor chloride channel[J]. J Biol Chem, 2001, 276(16):12556-12564. [116]Shoop W L, Mrozik H, Fisher M H. Structure and activity of avermectins and

Milbemycins in animal health[J]. Vet Parasitol, 1995, 59(2):139-156.

[117]伍一军，冷欣夫. 杀虫药剂的神经毒理学研究进展[J]. 昆虫学报, 2003,46(3): 382-389.

[118]程广东， 徐世文， 李术. 阿维菌素对鸽脑组织GABAA受体结合作用的影响[J].

中国兽医科学, 2007,37(11): 974-977.

[119] Huang J, Casida J E. Avermectin B1a binds to high- and low-affinity sites with dual effects on the gamma-aminobutyric acid-gated chloride channel of cultured cerebellar granule neurons[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1997, 281(1):261-266.

[120] Bloomquist J R. Chloride channels as tools for developing selective insecticides[J].

Arch Insect Biochem Physiol, 2003, 54(4):145-156.

[121] Campbell W C, Benz G W. Ivermectin: a review of efficacy and safety [J]. J Vet Pharmacol Ther, 1984, 7(1):1-16.

[122] Shoop W L, Haines H W, Michael B F, et al. Mutual resistance to avermectins and

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| milbemycins: oral  ivermectin-resistant | activity of ivermectin and  and susceptible nematodes[J]. | moxidectin  Vet Rec, | against  1993, |
| 133(18):445-447. |  |  |  |

[123]王秀坤, NielsenM. GABAA受体药理学研究进展[J]. 国外医学：药学分册, 2001,28(1): 29-34.

92

[124] Marriner S E, McKinnon I, Bogan J A. The pharmacokinetics of ivermectin after oral and subcutaneous administration to sheep and horses[J]. J Vet Pharmacol Ther, 1987, 10(2):175-179.

[125] Danaher M, O'Keeffe M, Glennon J D. Extraction and isolation of avermectins and milbemycins from liver samples using unmodified supercritical CO2 with in-line trapping on basic alumina[J]. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 2001, 761(1):115-123.

[126] Wu Z, Li J, Zhu L, et al. Multi-residue analysis of avermectins in swine liver by immunoaffinity extraction and liquid chromatography-mass spectrometry[J]. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 2001, 755(1-2):361-366.

[127]王海， 刘素英， 单吉浩， 等. 液相色谱法测定猪组织中阿维菌素类药物残留量

[J]. 中国兽药杂志, 2005(09): 12-15.

[128]孙英健，沈建忠，张启迪. 阿维菌素在蚯蚓体内的残留检测研究[J]. 中国农业科学, 2004(10)：1571-1574.

[129]陈静， 罗永煌， 付利芝. HPLC检测草鱼组织中阿维菌素和伊维菌素的多残留

[J]. 中国兽药杂志, 2009,43(12): 17-20.

[130] de Montigny P, Shim J S, Pivnichny J V. Liquid chromatographic determination of ivermectin in animal plasma with trifluoroacetic anhydride and N-methylimidazole as the derivatization reagent[J]. J Pharm Biomed Anal, 1990,8(6):507-511.

[131] Howells L, Sauer M J. Multi-residue analysis of avermectins and moxidectin by ion-trap LC-MSn[J]. Analyst, 2001, 126(2):155-160.

[132] Shi W, He J, Jiang H, et al. Determination of multiresidue of avermectins in bovine liver by an indirect competitive ELISA[J]. J Agric Food Chem, 2006, 54(17):6143-6146.

[133]武志雄， 胡江涛， 郑卫东， 等. 猪肉组织中阿维菌素、伊维菌素残留的高效液

相色谱-串联质谱法研究[J]. 四川大学学报：医学版, 2010, 41(3)：523-526.

[134]侯晓林，何继红，杜向党，等. 牛肝中阿维菌素类药物残留的高效液相色谱荧光检测方法的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2006, 37(5)：500-503.

[135]周德刚，李海燕，徐飞，等. 兔肌肉中多拉菌素残留检测方法及消除[J]. 中国兽医杂志, 2008, 44(12)：75-76.

[136]邢丽红，冷凯良，翟毓秀，等. 鲈鱼组织中阿维菌素、伊维菌素残留的高效液相色谱荧光检测法研究[J]. 海洋水产研究, 2008, 29(4)：52-57.

[137]林立峰，梁震. 高效液相色谱法检测鳗鱼组织中阿维菌素的残留量[J]. 食品科学, 2008, 29(3)：436-437.

93

[138]秦改晓，徐文彦，艾晓辉，等. 阿维菌素在草鱼体内的药物代谢动力学研究[J]. 西北农林科技大学学报：自然科学版, 2012, 40(8)：13-20.

[139] Elia A C, Ciccotelli V, Pacini N, et al. Transferability of oxytetracycline (OTC) from feed to carp muscle and evaluation of the antibiotic effects on antioxidant systems in liver and kidney[J]. Fish Physiol Biochem, 2014, 10.1007/s10695-013-9905-4.

[140]张启迪， 丁双阳， 邹明， 等. 鱼肌肉组织中阿维菌素残留的高效液相色谱法测

定[J]. 中国兽医杂志, 2008,44(8): 88-89.

[141] Drlica K, Xu C, Wang J Y, et al. Fluoroquinolone action in mycobacteria: similarity with effects in Escherichia coli and detection by cell lysate viscosity [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1996, 40(7):1594-1599.

[142] Drlica K. Mechanism of fluoroquinolone action[J]. Curr Opin Microbiol, 1999, 2(5):504-508.

[143] Carbone M, Pennisi M G, Masucci M, et al. Activity and postantibiotic effect of marbofloxacin, enrofloxacin, difloxacin and ciprofloxacin against feline Bordetella bronchiseptica isolates[J]. Veterinary Microbiology, 2001, 81(1):79-84.

[144]穆桂荣. 氟喹诺酮类药物不良反应临床分析[J]. 首都医药, 2009(22)：45。

[145] Grill M F, Maganti R K. Neurotoxic effects associated with antibiotic use: management considerations [J]. Br J Clin Pharmacol, 2011, 72(3):381-393.

[146] Barrett M J, Login I S. Gemifloxacin-associated neurotoxicity presenting as encephalopathy[J]. Ann Pharmacother, 2009, 43(4):782-784.

[147]范铭. 喹诺酮类药致老年人不良反应文献分析[J]. 中国药房, 2010（18）：

1704-1706.

[148]邓艳萍. 氟喹诺酮类药物对小鼠中枢神经毒性及其机制研究[D]. 北京医科大学药理学, 1999。

[149]栾双梅，沈建伟，张晓军，等. 喹诺酮类抗生素致精神症状分析[J]. 浙江中西医结合杂志, 2004(05)：59-60.

[150] Rasool S T, Tang H, Wu J, et al. Increased level of IL-32 during human immunodeficiency virus infection suppresses HIV replication [J]. Immunol Lett, 2008, 117(2):161-167.

[151] Shoda H, Fujio K, Yamaguchi Y, et al. Interactions between IL-32 and tumor necrosis factor alpha contribute to the exacerbation of immune-inflammatory diseases[J]. Arthritis Res Ther, 2006, 8(6):R166.

[152] Satoh Y, Sugiyama A, Chiba K, et al. QT-prolonging effects of sparfloxacin, a fluoroquinolone antibiotic, assessed in the *in vivo* canine model with monophasic action potential monitoring[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2000, 36(4):510-515.

94

[153]黄齐颐，房晶. 盐酸双氟沙星对大鼠致畸胎试验[J]. 中国兽药杂志, 1999, 33(4)：9-11.

[154] Burkhardt J E, Hill M A, Turek J J, et al. Ultrastructural changes in articular cartilages of immature beagle dogs dosed with difloxacin, a fluoroquinolone[J]. Vet Pathol, 1992, 29(3):230-238.

[155]司天梅， 舒良, Nielsen Mogens. 喹诺酮药物、对苯丙氨基苯乙酸与γ-氨基丁酸

A(GABA\_A)受体的相互作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2000, (03): 191-194.

[156]施杏芬，陆国林. 兽用喹诺酮类药物残留的危害及对策[J]. 中国动物检疫, 2008, 25(9)： 16-17.

[157]李强， 朱雄， 等. 喹诺酮类抗菌剂结构与不良反应之间的关系[J]. 药学进展，

2003,27(1): 29-33.

[158] Matsuo H, Ryu M, Nagata A, et al. Neurotoxicodynamics of the interaction between ciprofloxacin and foscarnet in mice[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1998, 42(3):691-694.

[159] Camargo E E, Sostre S, Sadzot B, et al. Global and regional cerebral metabolic rate of 2-[18F] fluoro-2-deoxy-D-glucose in the presence of ofloxacin, a gamma-aminobutyric acid a receptor antagonist[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1991, 35(4):648-652.

[160] Motomura M, Kataoka Y, Takeo G, et al. Hippocampus and frontal cortex are the potential mediatory sites for convulsions induced by new quinolones and non-steroidal anti-inflammatory drugs[J]. Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol, 1991, 29(6):223-227.

[161]周义文， 钱元恕， 陆杰. 环丙沙星致痫大鼠脑脊液氨基酸含量的变化[J]. 中国

抗生素杂志, 2003,28(5): 295-298.

[162] Zhao Y, Sun Y, Li C. Simultaneous determination of ginkgo flavonoids and terpenoids in plasma: ammonium formate in LC mobile phase enhancing electrospray ionization efficiency and capacity [J]. J Am Soc Mass Spectrom, 2008, 19(3):445-449.

[163]黄晓蓉， 郑晶， 李寿崧， 等. 鳗鱼及其制品中喹诺酮类药物残留的微生物快速

检测方法研究[J]. 淡水渔业, 2005(04): 3-6.

[164] Pena A, Silva L J, Pereira A, et al. Determination of fluoroquinolone residues in poultry muscle in Portugal[J]. Anal Bioanal Chem, 2010, 397(6):2615-2621.

[165] Moema D, Nindi M M, Dube S. Development of a dispersive liquid-liquid microextraction method for the determination of fluoroquinolones in chicken liver by high performance liquid chromatography[J]. Anal Chim Acta, 2012, 730:80-86.

[166] Yang Z, Wang X, Qin W, et al. Capillary electrophoresis-chemiluminescence

95

Determination of norfloxacin and prulifloxacin[J]. Anal Chim Acta, 2008, 623(2):231-237.

[167]沈虎琴， 檀华蓉， 祁克宗， 等. 高效毛细管电泳法同时分离氟喹诺酮类与四环

素类药物的研究[J]. 安徽农业大学学报, 2012(02): 207-210. [168]曾振灵， 丁焕中， 黄显会， 等. 二氟沙星在猪体内的药物动力学及生物利用度

研究[J]. 中国农业科学, 2003,36(7): 846-850.

[169] Frazier D L, Thompson L, Trettien A, et al. Comparison of fluoroquinolone pharmacokinetic parameters after treatment with marbofloxacin, enrofloxacin, and difloxacin in dogs[J]. J Vet Pharmacol Ther, 2000, 23(5):293-302.

[170]丁焕中， 曾振灵， 杨桂香， 等. 二氟沙星在鸡体内的药物代谢动力学及生物利

用度研究[J]. 中国兽医科技, 2004,34(6): 20-24.

[171]李海迪，杨先乐，胡鲲，等. 双氟沙星及其代谢产物在中华绒螯蟹体内药物代谢及残留消除规律[J]. 动物学杂志, 2009, 44(2)：12-20.

[172]盖春蕾. 二氟沙星在牙鲆体内的药动学及体外抗菌后效应的研究[D]. 上海水产大学上海海洋大学临床兽医学, 2007。

[173]阮记明，胡鲲，章海鑫，等. 两种水温条件下异育银鲫体内双氟沙星药代动力学比较[J]. 上海海洋大学学报, 2011(06)：858-865.

[174] Ding F, Cao J, Ma L, et al. Pharmacokinetics and tissue residues of difloxacin in crucian carp (Carassius auratus) after oral administration[J]. Aquaculture, 2006, 256(1-4):121-128.

[175]房文红， 于慧娟， 蔡友琼， 等. 恩诺沙星及其代谢物环丙沙星在欧洲鳗鲡体内

的代谢动力学[J]. 中国水产科学, 2007,14(4): 622-629.

[176]王翔凌， 方之平， 操继跃， 等. 盐酸沙拉沙星在鲫体内的残留及消除规律研究

[J]. 水生生物学报, 2006,30(2): 198-203.

[177] Brambilla F, Biggio G, Pisu M G, et al. Neurosteroid secretion in panic disorder[J].

Psychiatry Research, 2003, 118(2):107-116.

[178] Watanabe M, Maemura K, Kanbara K, et al. GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs[J]. International Review of Cytology-A Survey Of Cell Biology, 2002, 213:1-47.

[179] Wisden W, Seeburg P H. GABAA receptor channels: from subunits to functional entities [J]. Current Opinion in Neurobiology, 1992, 2(3):263-269.

[180] Araki T, Sato M, Kiyama H, et al. Localization of GABAA-receptorγ2-subunit mRNA-containing neurons in the rat central nervous system[J]. Neuroscience, 1992, 47(1):45-61.

[181] Fenelon V S, Herbison A E. Characterisation of GABAA receptor gamma subunit

96

Expression by magnocellular neurones in rat hypothalamus [J]. Molecular Brain Research, 1995, 34(1):45-56.

[182] Araki T, Tohyama M. Region-specific expression of GABAA receptorα3 andα4 subunits mRNAs in the rat brain[J]. Molecular Brain Research, 1992, 12(4):293-314.

[183] Harvey R J, Kim H C, Darlison M G. Molecular cloning reveals the existence of a fourth*γ*subunit of the vertebrate brain GABA(A) receptor[J]. FEBS Lett., 1993,331(3).

[184] Glencorse T A, Bateson A N, Hunt S P, et al. Distribution of the GABAA receptorα1- andγ2-subunit mRNAs in chick brain[J]. Neuroscience Letters, 1991, 133(1):45-48.

[185] Castro A, Aguilar J, Andrés C, et al. GABA A receptors mediate motoneuron tonic inhibition in the turtle spinal cord[J]. Neuroscience, 2011, 192(0):74-80.

[186] Chen J C, Chesler M. A bicarbonate-dependent increase in extracellular pH mediated by GABAA receptors in turtle cerebellum[J]. Neuroscience Letters, 1990, 116(1–2):130-135.

[187] Anzelius M, Ekström P, Möhler H, et al. Immunocytochemical localization of GABAA receptorβ2β3-subunits in the brain of Atlantic salmon (Salmo salar L)[J]. Journal of Chemical Neuroanatomy, 1995, 8(3):207-221.

[188] Asay M J, Boyd S K. Characterization of the binding of [3H] CGP54626 to

GABAB receptors in the male bullfrog (Rana catesbeiana)[J]. Brain Research, 2006, 1094(1):76-85.

[189] Hollis D M, Boyd S K. Characterization of the GABAA receptor in the brain of the adult male bullfrog, Rana catesbeiana[J]. Brain Research, 2003, 992(1):69-75.

[190] Lummis S C R, Sattelle D B. Insect central nervous systemγ-aminobutyric acid[J].

Neuroscience Letters, 1985, 60(1):13-18.

[191] Hosie A, Sattelle D, Aronstein K, et al. Molecular biology of insect neuronal GABA receptors[J]. Trends in Neurosciences, 1997, 20(12):578-583.

[192] Adelsberger H, Brunswieck S, Dudel J. Modulatory effects ofγ-hydroxybutyric acid on a GABAA receptor from crayfish muscle[J]. European Journal of Pharmacology, 1998, 350(2–3):317-323.

[193] Rashkovan G, Fisher K, Parnas I. GABAA receptors affect directly the release boutons in the neuromuscular junction of the crayfish opener muscle [J]. Neuroscience Letters, 1997,237, Supplement 48(0):S40.

[194] Ong J, Kerr D I B. GABA-receptors in peripheral tissues[J]. Life Sciences, 1990, 46(21):1489-1501.

[195] Rotondo A, Serio R, Mul F. Functional evidence for different roles of GABAA and

97

GABAB receptors in modulating mouse gastric tone[J]. Neuropharmacology, 2010, 58(7):1033-1037.

[196] Alam S, Laughton D L, Walding A, et al. Human peripheral blood mononuclear cells express GABAA receptor subunits[J]. Molecular Immunology, 2006, 43(9):1432-1442.

[197] Plummer P N, Colson N J, Lewohl J M, et al. Significant differences in gene expression of GABA receptors in peripheral blood leukocytes of migraineurs[J]. Gene, 2011, 490(1–2):32-36.

[198] Tian J, Chau C, Hales T G, et al. GABAA receptors mediate inhibition of T cell responses[J]. Journal of Neuroimmunology, 1999, 96(1):21-28.

[199] Bjurstöm H, Wang J, Ericsson I, et al. GABA, a natural immunomodulator of T lymphocytes[J]. Journal of Neuroimmunology, 2008, 205(1–2):44-50.

[200] ErdöS L, Ezer E, Matuz J, et al. GABA A receptors in the rat stomach may mediate mucoprotective effects[J]. European Journal of Pharmacology, 1989, 165(1):79-86.

[201] Borboni P, Porzio O, Fusco A, et al. Molecular and cellular characterization of the GABAA receptor in the rat pancreas[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 1994, 103(1–2):157-163.

[202] Yang W, Reyes A A, Lan N C. Identification of the GABAA receptor subtype mRNA in human pancreatic tissue [J]. FEBS Letters, 1994, 346(2–3):257-262. [203]Akinci M K, Schofield P R. Widespread expression of GABAA receptor subunits

In peripheral tissues[J]. Neuroscience Research, 1999, 35(2):145-153.

[204] Kim Y, Nam R, Yoo Y M, et al. Identification and functional evidence of GABAergic neurons in parts of the brain of adult zebrafish (Danio rerio)[J]. Neuroscience Letters, 2004,355(1-2):29-32.

[205] Gladkevich A, Korf J, Hakobyan V P, et al. The peripheral GABAergic system as a target in endocrine disorders [J]. Autonomic Neuroscience, 2006, 124(1–2):1-8.

[206] Tanaka C. γ-aminobutyric acid in peripheral tissues[J]. Life Sciences, 1985, 37(24):2221-2235.

[207] de Groote L, Linthorst A C E. Exposure to novelty and forced swimming evoke stressor-dependent changes in extracellular GABA in the rat hippocampus [J]. Neuroscience, 2007, 148(3):794-805.

[208] Lerma J, Herranz A S, Herreras O, et al. *In vivo* determination of extracellular concentration of amino acids in the rat hippocampus. A method based on brain dialysis and computerized analysis [J]. Brain Research, 1986, 384(1):145-155.

[209] Segovia J, Tossman U, Herrera-Marschitz M, et al. γ-Aminobutyric acid release in the globus pallidus *in vivo* after a 6-hydroxydopamine lesion in the substantia nigra of the rat[J]. Neuroscience Letters, 1986, 70(3):364-368.

98

[210] Zhao J, Bao A M, Qi X R, et al. Gene expression of GABA and glutamate pathway markers in the prefrontal cortex of non-suicidal elderly depressed patients[J]. Journal of Affective Disorders, 2012, 138(3):494-502.

[211] Mao X, Guo F, Yu J, et al. Up-regulation of GABA transporters and GABAA receptorα1 subunit in tremor rat hippocampus[J]. Neuroscience Letters, 2010, 486(3):150-155.

[212] Zheng G, Zhang X, Chen Y, et al. Evidence for a role of GABAA receptor in the acute restraint stress-induced enhancement of spatial memory[J]. Brain Research, 2007, 1181(0):61-73.

[213] Gruen R J, Wenberg K, Elahi R, et al. Alterations in GABAA receptor binding in the prefrontal cortex following exposure to chronic stress[J]. Brain Research, 1995, 684(1):112-114.

[214] Baulieu E E, Robel P, Schumacher M. Neurosteroids: Beginning of the story[J].

International Review of Neurobiology, 2001, 46:1-32.

[215] Benavidez E, Arce A. Effects of phosphorylation and cytoskeleton-affecting reagents on GABAA receptor recruitment into synaptosomes following acute stress[J]. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 2002, 72(3):497-506.

[216] Chadda R, Devaud L L. Differential effects of mild repeated restraint stress on behaviors and GABAA receptors in male and female rats[J]. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 2005, 81(4):854-863.

[217] Gutiérrez A, Khan Z U, Miralles C P, et al. GABA A receptor subunit expression changes in the rat cerebellum and cerebral cortex during aging[J]. Molecular Brain Research, 1997, 45(1):59-70.

[218] Gutiérrez A, Khan Z U, Miralles C P, et al. Altered expression ofγ2L andγ2S GABAA receptor subunits in the aging rat brain[J]. Molecular Brain Research, 1996, 35(1–2):91-102.

[219]周小毛， 吴青君， 胡美英， 等. 小菜蛾γ-氨基丁酸受体基因片段的克隆、表达及

特征分析[J]. 园艺学报, 2006,33(2): 300-305.

[220] Liste I, Caruncho H J, Guerra M J, et al. GABAA receptor subunit expression in intrastriatal striatal grafts: Comparison between normal developing striatum and developing striatal grafts[J]. Developmental Brain Research, 1997, 103(2):185-194. [221]McCracken D I. The potential for avermectins to affect wildlife[J]. Veterinary

Parasitology, 1993, 48(1–4):273-280.

[222] Tatjana Tišler, Eržen N K. Abamectin in the aquatic environment[J].

Ecotoxicology, 2006, 16(15):495-502.

[223]严海娟，于莉，夏锦瑜，等. 阿维菌素和氟虫腈对锦鲫的急慢性毒性效应[J]. 江苏农业科学, 2011(4)：363-365.

99

[224]王锡珍， 陆宏达. 关于阿维菌素对异育银鲫的急性毒性和组织病理研究[J].

大连水产学院学报, 2010,25(1): 66-70.

[225]郑燕，蔡雷鸣. 阿维菌素对南美白对虾的急性毒性试验[J]. 现代农业科技, 2009(23)：326-327.

[226]秦改晓， 袁科平， 艾晓辉. 高效液相色谱法测定水产品中阿维菌素的残留量

[J]. 华中农业大学学报, 2009,28(1): 84-88.

[227]李家泰. 临床药理学[M]. 北京：人民卫生出版社, 1997。

[228]沈建忠. 动物毒理学[M]. 北京： 中国农业出版社, 2004。

[229]周凤霞. 生物监测[M]. 北京： 化学工业出版社, 2006。

[230]谢文平，马广智，赖子尼. 氯氰菊酯和有机磷农药对草鱼鱼种急性及联合毒性[J]. 水利渔业, 2006, 26（1）。

[231] Halley B A, VandenHeuvel W J A, Wislocki P G. Environmental effects of the usage of avermectins in livestock[J]. Veterinary Parasitology, 1993, 48(1–4):109-125.

[232] Vlasta Jenči, ManicaČerne, Nevenka Kožuh Eržen, et al. Abamectin effects on rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)[J]. Ecotoxicology, 2006, 3(15):249-257.

[233]张启迪， 潘宗海， 刘文华， 等. 阿维菌素对鲟鱼的急性毒性试验研究[J]. 现代

农业科技, 2007(24):153.

[234]杨代勤，阮国良，刘家芳，等. 阿维菌素对黄鳝及棘头虫的毒性影响[J]. 湖北农业科学, 2009, 48(8)：1973-1975.

[235]李常健，骆鹰，杨锦兀，等. 阿维菌素・毒死蜱对草鱼的毒性效应研究[J]. 植物病虫害研究：英文版, 2011, 39(1)：67-70.

[236]蔡道基. 农药环境毒理学研究[M]. 北京： 中国环境科学出版社, 1999。

[237]吴雪，欧阳丽娜，向大位，等. 药物血脑屏障通透性评价方法的研究进展[J]. 中国医院药学杂志, 2010(10)：862-864.

[238]丁明玉，罗施中，刘海，等. 反相高效液相色谱法测定实验动物血液和脑组织中川芎嗪[J]. 色谱, 2000(01)：48-50.

[239] BilandžićN, KolanovićB S, Varenina I, et al. Veterinary drug residues determination in raw milk in Croatia[J]. Food Control, 2011, 22(12):1941-1948. [240]Escudero E, Marín P, Cárceles C M, et al. Pharmacokinetic and milk penetration

Of a difloxacin long-acting poloxamer gel formulation with carboxy-methylcellulose in lactating goats[J]. The Veterinary Journal, 2011, 188(1):92-95.

[241] Hoy T, Horsberg T E, Nafstad I. The Disposition of ivermectin in Atlantic Salmon

100

(Salmo salar)[J]. Pharmacology and Toxicology, 1990(67):307-312.

[242]程广东. 阿维菌素致王鸽脑组织损伤机理的研究[D]. 东北农业大学东北农业大学临床兽医学, 2005。

[243]倪彩霞，曾南，汤奇，等. 芳香开窍药对脑缺血再灌注损伤小鼠血脑屏障通透性的影响[J]. 时珍国医国药，2011, 22(11)：2639-2640.

[244]蒋国会， 李光， 勤朱洁. 强力霉素对溶栓脑缺血大鼠血脑屏障通透性的影响

[J]. 卒中与神经疾病, 2009,16(1): 30-33.

[245] Roth M, Richards R H, Sommerville C. Current Practices in the Chemotherapeutic Control of Sea Lice Infestations in Aquaculture-A Review[J]. Journal of Fish Diseases, 1993(16):1-26.

[246] Olsen R W, Tobin A J. Molecular biology of GABAA receptors [J]. FASEB J, 1990, 4(5):1469-1480.

[247] Sieghart W. Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes [J]. Pharmacol Rev, 1995, 47(2):181-234.

[248]陈忠， 李书珍， 朱剑琴. 急性热应激对小鼠大脑皮质GABA受体的影响[J]. 南

京大学学报：数学半年刊, 1997(3): 386-391.

[249]张蓉，李峰，李维，等. 中药对疲劳大鼠脑内学习记忆相关递质谷氨酸及γ-氨基丁酸受体mRNA表达的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2011，(08)：39-41.

[250]张献全，范卫东. 慢性二氧化碳潴留大鼠脑GABAA受体mRNA的变化研究[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(9)：823-825.

[251] Dreshaj I A, Haxhiu M A, Abu-Shaweesh J, et al. CO2-induced prolongation of expiratory time during early development[J]. Respir Physiol, 1999, 116(2-3):125-132.

[252] Abu-Shaweesh J M, Dreshaj I A, Thomas A J, et al. Changes in respiratory timing induced by hypercapnia in maturing rats[J]. J Appl Physiol (1985), 1999, 87(2):484-490.

[253]任锐， 李本长， 郑晶， 等. 阿维菌素对大鼠大脑皮层中神经代谢酶的影响[J].

环境与健康杂志, 2009,26(2): 116-118.

[254]杨先乐. 《新编渔药手册》[J]. 农村养殖技术：新兽医, 2006(5)：63。

[255]张艳， 彭麟， 贺培益， 等. 盐酸二氟沙星混悬乳注射液的急性毒性和蓄积毒性

[J]. 江苏农业科学, 2011(4): 260-262.

[256]沈川，沈建忠. 双氟沙星对小鼠的显性致死试验[J]. 中国兽药杂志, 2000, 34(5)：16-18.

[257]黄齐颐，房晶. 盐酸双氟沙星对大鼠致畸胎试验[J]. 中国兽药杂志, 1999, 33（4）：

9-11.

101

[258]魏东，李振华，张乃生. 氟喹诺酮类药物的不良反应[J]. 动物医学进展，2006, 27(7)：105-107.

[259]易冬玲， 易晓玲. 氟喹诺酮类药物的神经毒性及其防治进展[J]. 医药导报，

2010,29(9): 1183-1184.

[260] de Lange E C M, Marchand S, van den Berg D, et al. *In vitro* and *in vivo* investigations on fluoroquinolones; effects of the P-glycoprotein efflux transporter on brain distribution of sparfloxacin[J]. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2000, 12(2):85-93.

[261] Jaehde U, Goto T, de Boer A G, et al. Blood-brain barrier transport rate of quinoline antibacterials evaluated in cerebrovascular endothelial cell cultures[J]. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 1993, 1(1): 49-55.

[262]李海迪. 双氟沙星及其代谢产物在中华绒螯蟹体内药动学研究及其合理应用

[D]. 上海海洋大学临床兽医, 2009。

[263]丁俊仁，艾晓辉，汪开毓，等. 强力霉素在斑点叉尾体内药物动力学及残留消除规律研究[J]. 水生生物学报, 2012, 36(1)：126-132.

102

附录**A**缩略词表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 缩写词 | 英文全称 | 中译名 |
| AVM | Avermectin | 阿维菌素 |
| ARs | / | A 型 GABA 受体 |
| ARβ2a | / | A 型 GABA 受体 β2 亚基 a 亚型 |
| ARβ2b | / | A 型 GABA 受体 β2 亚基 b 亚型 |
| BBB | Blood-brain barrier | 血脑屏障 |
| bp | Base pairs | 碱基对 |
| BRs | / | B 型 GABA 受体 |
| BZ | benzodiazepines | 苯二氮卓类药物 |
| Cer | Cerebella | 小脑 |
| CRs | / | C 型 GABA 受体 |
| CNS | Central nervous system | 中枢神经系统 |
| DIF | Difloxacin | 双氟沙星 |
| ddH2O | Double distilled H2O | 双蒸水 |
| EA | Ethyl alocohol | 乙醇 |
| FQs | Fluoroquinolones | 氟喹诺酮类药物 |
| GABAR | GABA Receptor | GABA 受体 |
| GABA-T | GABA transaminase | GABA 转氨酶 |
| GAD | Glutamatedecarboxylase | 谷氨酸脱羧酶 |
| HPLC | High Performance Liquid  Chromatography | 高效液相色谱法 |
| LOD | Limit of detection | 最低检测限 |
| Med | Medulla oblongata | 延脑 |
| Mes | Mesencephalon | 中脑 |
| NCBI | National Center for Biotechnology  Information | 美国国家生物技术信息中心 |
| ms | millisecond | 毫秒 |
| OD | Optical density | 光密度 |
| PCR | Polymerase Chain Reaction | 聚合酶链式反应 |
| PIC | picrotoxin | 印防己毒素 |
| qPCR | Real-time quantitative PCR | 实时荧光定量 PCR |
| RP-HPLC | Reverse phase high performance liquid  Chromatorgraphic | 反相高效液相色谱法 |
| SC | Safe concentration | 安全浓度 |
| Tel | Telencephalon | 端脑 |

103

附录**B**各基因引物目的序列与测序序列比对结果

各基因（β-actin、ARβ2a、ARβ2b、GAD65、GAD67和GABA-T）PCR产物测序结果与目的序列比对结果如下：

**B-1、*β-*Actin目的序列与测序序列比对结果**目的序列（124bp：

TACGTTGCCATCCAGGCTGTGCTGTCCCTGTATGCCTCTGGTCGTACCAC TGGTATCGTGATGGACTCTGGTGATGGTGTCACCCACACTGTGCCCATC TACGAGGGTTACGCCCTGCCCCATG

测序序列（125bp）：

TACGTTGCCATCCAGGCTGTGCTGTCCCTGTATGCCTCTGGTCGTACCAC TGGTATCGTGATGGACTCTGGTGATGGTGTCACCCACACTGTGCCCATC TACGAGGGTTACGCCCTGCCCCATGA

**B-2、ARβ2a目的序列与测序序列比对结果**目的序列（125bp）：

CCCGTGTGGCTTTAGGTATCACCACCGTGCTGACCATGACCACCATTAA TACTCACTTGCGAGAGACCCTTCCCAAGATCCCCTATGTGAAAGCCATA GACATGTACCTGATGGGCTGCTTTGTC

测序序列（128bp）：

CCCGTGTGGCTTTAGGTATCACCACCGTGCTGACCATGACCACCATTAA TACTCACTTGCGAGAGACCCTTCCCAAGATCCCCTATGTGAAAGCCATA GACATGTACCTGATGGGCTGCTTTGTCCGA

**B-3、ARβ2b目的序列与测序序列比对结果**目标序列（125bp）：

CCCGTGTGGCTTTAGGTATCACCACCGTGCTGACCATGACCACCATTAA TACTCACTTGCGAGAGACCCTTCCCAAGATTCCCTATGTGAAAGCCATA GACATGTACCTGATGGGCTGCTTTGTC

测序结果（127bp）：

TCCCGTGTGGCTTTAGGTATCACCACCGTGCTGACCATGACCACCATTAAT ACTCACTTGCGAGAGACCCTTCCCAAGATCCCCTATGTGAAAGCCATAGA CATGTACCTGATGGGCTGCTTTGTCA

**B-4、GAD65目的序列与测序序列比对结果**目标序列（246bp）：

104

上海海洋大学博士学位论文

TTCTCTGTCGCTGCTCTGATCCGCTCCGTTCGCGATGGCATCTCACGGGT TTTGGTTTCTGGGTGCTGAAAACGCGTCTGGAGACGGCAGTCAAAGCCC GAACACTCCCAGAGCATGGTGTCAGGCGGCGGCCCAGAAATTCTCCGG AGGAATCGGCTCCAAATTATGTGCTCTGTTAAATGTCGGGGAGGCTGAG AAAGCAGCTCAAGCCCCAGTTAAAGCAGAAGATGGGTCTACAGCCGAG AG

测序结果（248bp）：

TTTCTCTGTCGCTGCTCTGATCCGCTCCGTTCGCGATGGCATCTCACGGG TTTTGGTTTCTGGGTGCTGAAAACSCGTCTGGAGACGGCAGTCAAAGCC CGAACACTCCCAGAGCATGGTGTCAGGCGGCGGCCCAGAAATTCTCCG GAGGAATCGGCTCCAAATTATGTGCTCTGTTAAATGTCGGGGAGGCTGA GAAAGCAGCTCAAGCCCCAGTTAAAGCAGAAGATGGGTCTACAGCCGA GAGA

**B-5、GAD67目的序列与测序序列比对结果**目标序列（208bp）：

TTTTCTGATATCAAGCGTCTCACAGCCACGTCACGCGGTGTGAAACATCC TCCGCGTGCCTCCGTTTTTCTGGACTTTATTGTGACACCTGTGACTTCGTA AGTCTGAAAGCCGTGAGGTGTTTCTCCTGGACTGATGGCGTCTTCTGCAC CTTCTTCCTCGGCTCCTGATATGGACCCAAACACGGCTAATTTACGACAA CCTGCCA

测序结果（248bp）:

TGTTTTCTGATATCAAGCGTCTCACAGCCACGTCACGCGGTGTGAAACA TCCTCCGCGTGCCTCCGTTTTTCTGGACTTTATTGTGACACCTGTGACTT CGTAAGTCTGAAAGCCGTGAGGTGTTTCTCCTGGACTGATGGCGTCTTC TGCACCTTCTTCCTCGGCTCCTGATATGGACCCAAACACGGCTAATTTAC GACAACCTGCCAA

**B- 6、GABA-T目的序列与测序序列比对结果**

目标序列（115bp）：GCTGCCTGGCCACAACACATTCCAAAGCTATTCACAAGCTGGATATACC GTCCTTCGACTGGCCCATCGCACCCTTCCCTAAGCTGCAGTACCCTCTGG AGGAGTTTGTGAGGGA

测序结果（116bp）：

TGCTGCCTGGCCACAACACATTCCAAAGCTATTCACAAGCTGGATATAC CGTCCTTCGACTGGCCCATCGCACCCTTCCCTAAGCTGCAGTACCCTCTG GAGGAGTTTGTGAGGGA

105

附录**C**各基因荧光定量标准及熔解曲线

C- 1、*β*-Actin荧光定量标准及熔解曲线

图C-1（a）β-Actin荧光定量标准曲线

Fig. C-1(a) qPCR standard curve ofβ-Actin



图C-1（b）β-Actin荧光定量熔解曲线

Fig. C-1(b) qPCR melting curve ofβ-Actin

C-2、ARβ2a荧光定量标准及熔解曲线

图C-2（a）ARβ2a荧光定量标准曲线



106



Fig. C-2(a) qPCR standard curve of AR*β*2a

图C-2（b）ARβ2a荧光定量熔解曲线

Fig. C-2(b) qPCR melting curve of ARβ2a



C-3、ARβ2b荧光定量标准及熔解曲线

图C-3（a）ARβ2b荧光定量标准曲线

Fig. C-3(a) qPCR standard curve of ARβ2b



图C-3（b）ARβ2a荧光定量熔解曲线

Fig. C-3(b) qPCR melting curve of ARβ2a

107



C-4、GAD65荧光定量标准及熔解曲线

图C-4（a）GAD65荧光定量标准曲线

Fig. C-4(a) qPCR standard curve of GAD65



图C-4（b）GAD65荧光定量熔解曲线

Fig. C-4(b) qPCR melting curve of GAD65



C-5、GAD67荧光定量标准及熔解曲线

图C-5（a）GAD67荧光定量标准曲线

Fig. C-5(a) qPCR standard curve of GAD67

108



图C-5（b）GAD67荧光定量熔解曲线

Fig. C-5(b) qPCR melting curve of GAD67



C-6、GABA-T荧光定量标准及熔解曲线

图C-6（a）GABA-T荧光定量标准曲线

Fig. C-6(a) qPCR standard curve of GABA-T



图C-6（b）GABA-T荧光定量熔解曲线

Fig. C-6(b) qPCR melting curve of GABA-T

109

**附录D** 攻读学位期间发表的与学位论文相关的学术文章

**D-1发表学术论文**

1、RUAN Ji-ming, HU Kun, ZHANG Hai-xin, WANG Yi, ZHOU Ai-ling, ZHAO Yi-ni, YANG Xian-le\*．Distribution and quantitative detection of GABAA receptor in *Carassius auratus gibelio.* Fish Physiology and Biochemistry (DOI: 10.1007/s10695-014-9925-8)（2012-2013 IF:1.545）.

2、阮记明，胡鲲，杨先乐，等. 双氟沙星对异育银鲫血脑屏障渗透性及消除规律[J]. 水生生物学报. 2014(2)：272-278。

3、阮记明，胡鲲，杨先乐\*，章海鑫，王祎，周爱玲，赵依妮．异育银鲫体内阿维菌素血脑屏障渗透性及组织残留研究．中国水产科学，2013，（05）：1032-1038

4、阮记明，胡鲲，章海鑫，王会聪，付乔芳，杨先乐\*．两种水温条件下异育银鲫体内双氟沙星代谢动力学比较[J]．上海海洋大学学报，2011, 20(6)：858-865。

**D-2参加学术会议**

1、阮记明1, 2；胡鲲1；杨先乐1等。双氟沙星对异育银鲫毒性及大脑渗透性研究。2012年全国博士研究生学术论坛---可持续的水产养殖：理论与实践。2012.12.7-9（摘要）；

2、Ji-Ming Ruan 1, 2, Kun-HU 2, Hai-Xin Zhang2, Yi Wang2, Xian-Le Yang 2\*. Distribution and Quantitative detection of GABAA receptor in *Carassius auratus gibelio.*

中国水产学会鱼病学专业委员会2012年学术讨论会. 2012.11.6-8（报告）；

3、阮记明1, 2，章海鑫2，王祎2，杨先乐2。异育银鲫γ-氨基丁酸A型受体组织表达研究. 中国水产学会鱼病学专业委员会2011年学术讨论会. 2011.11.12-14（报告）；

4、Ruan Ji-ming, Hu Kun, Zhang Hai-xin, Wang Hui-cong, Fu Qiao-fang, Yang Xian-le. Pharmacokinetics comparisons of DIF and its Metabolite in Crucian carp at two Different water temperatures. the 9th Asian Fisheries and Aquaculture Forum (9AFAF).2011-04(poster); 2011.04.21-25;

5、阮记明，杨先乐，章海鑫．我国罗非鱼疾病流行的态势及其控制措施。2010

110

上海海洋大学博士学位论文

年中国首届渔药研制与规范使用专题学术大会暨中国水产学会渔药行业协作网成立大会.2010.09.13-16（报告）。

6、2010年3月份研究生论文报告会。两种水温下异育银鲫体内双氟沙星药代动力学研究，2010.03.22（报告）。

111

致 **谢**

本论文是在导师杨先乐教授的悉心关怀和精心指导下完成的。尊师知识渊博、科学态度严谨、科学思维敏捷且开阔、师德崇高

且宽厚仁爱，令学生铭感终生！五年来在生活上、学习上甚至工作上一直得到尊师莫大的关心、指导及帮助，学生将永远铭记在心！在此，谨向尊师致以最由衷的敬意和最诚挚的感谢！

另外，读博期间始终得到国家水生动物病原库胡鲲等十位老师给予的帮助和支持，在此表示衷心的感谢！

还有要感谢本实验室的章海鑫、王祎、周爱玲、赵依妮、欧仁健、叶鑫、杨移斌、孙琪等各位师弟师妹给予的帮助和支持！

本论文得到了国家自然科学基金（No.31172430）、科技部863计划项目（2011AA10A216）、农业公益性行业专项（201203085）的资助，在此表示衷心的感谢！

感谢我们双方的父母、家人对我的关爱以及对我学业的理解和支持！尤其感谢我的爱人和我的儿子在我五年求学中给予的鼓励和支持！

再次向所有关心、帮助我的老师、同学、朋友及家人致以诚挚的感谢！

阮记 明

二零一四年六月于上海

112