

## 喹诺酮类药物对中华绒螯蟹血清酶的影响

Effects of quinolones on hemolymph enzymes of chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*

王海潮<sup>1,2</sup> 张兴桃<sup>1,2</sup> 董增<sup>1</sup> 吴萧<sup>1</sup>

WANG Hai-chao<sup>1,2</sup> ZHANG Xing-tao<sup>1,2</sup> DONG Zeng<sup>1</sup> WU Xiao<sup>1</sup>

(1. 宿州学院生物与食品工程学院, 安徽 宿州 234000; 2. 宿州学院特色种植业苗种生产工程技术研究中心, 安徽 宿州 234000)

(1. College of Biological and Food Engineering, Suzhou University, Suzhou, Anhui 234000, China; 2. Engineering Technology Research Center of Characteristics of Planting and Seedling Production, Suzhou University, Suzhou, Anhui 234000, China)

**摘要:**以中华绒螯蟹为材料,研究诺氟沙星、氧氟沙星和恩诺沙星 3 种喹诺酮类药物对中华绒螯蟹血清免疫酶指标的影响。以 5 mg/kg 体重注射中华绒螯蟹,定期测定血清酚氧化酶(PO)、过氧化物酶(POD)、碱性磷酸酶(ALP)、溶菌酶(LSZ)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷草转氨酶(AST)和谷丙转氨酶(ALT)的活力。结果表明:注射药物后,PO、POD、ALP、LSZ、SOD 活力均显著提高( $P < 0.05$ ),其中恩诺沙星试验组影响极为显著( $P < 0.01$ ),随后逐渐下降,至 96 h 与对照组基本相同;AST 和 ALT 活力在试验期间均显著降低( $P < 0.05$ )。上述结果表明喹诺酮类药物以 5 mg/kg 体重剂量注射对中华绒螯蟹血清免疫酶无明显不良影响,对脏器无损害,此浓度的喹诺酮类药物对中华绒螯蟹有免疫促进作用。

**关键词:**喹诺酮类药物;中华绒螯蟹;血清酶

**Abstract:** Norfloxacin, ofloxacin and enrofloxacin, the most common used quinolones in aquaculture, were evaluated for the effects on hemolymph enzymes of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. The hemolymphs were collected at regular time for detection of phenoloxidase (PO), peroxidase (POD), alkaline phosphatase (ALP), lysozyme (LSZ), superoxide dismutase (SOD), glutamic-oxaloacetic transaminase (AST) and glutamic-pyruvic transaminase (ALT) after Chinese mitten crab were injected intramuscularly with quinolones at concentration of 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . The results showed that activity of PO, POD, ALP, LSZ and SOD increased respectively ( $P < 0.05$ ), and the

effect of enrofloxacin experimental group was very obvious ( $P < 0.01$ ), and decreased to the normal levels as the control group at 96 h. The activity of AST and ALT after quinolones injection showed significantly lower during the experimental period ( $P < 0.05$ ). These results indicated that quinolones did not result in inhibition on hemolymph immune enzyme and damage on viscera organs. Moreover, quinolones showed immune enhancement on at concentration of 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

**Keywords:** quinolones; *Eriocheir sinensis*; hemolymph enzymes

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)属甲壳纲、十足目、方蟹科,又称河蟹,味道鲜美,营养丰富,是一种经济蟹类,是中国传统的名贵水产品之一<sup>[1]</sup>。近年来,河蟹日益严重的病害问题已成为养蟹产业发展的主要阻碍因素之一。在蟹类疾病防治中,抗菌药物发挥着重要作用,但由于病原微生物的耐药性和机体药物残留等问题,部分药物使用已受到了严格的限制。因此,研究抗菌药物对机体的免疫影响来指导用药就具有十分重要的意义。

喹诺酮类(quinolones)药物具有广谱、高效、低残留、毒副作用小、不易产生耐药性等优点,是常用的临床抗菌药物,也是鱼病防治上公认的理想抗菌药物<sup>[2-4]</sup>,目前水产上常用的喹诺酮类药物主要有诺氟沙星、氧氟沙星和恩诺沙星等。范红结等<sup>[5]</sup>报道恩诺沙星对中华绒螯蟹的雷氏普罗威登菌(*Providencia rettgeri*)敏感度很高;张雅斌等<sup>[6]</sup>用恩诺沙星对细菌性败血症等 5 种喹诺酮类药物几乎对水生动物所有病原菌表现出较强的抗菌作用。喹诺酮类药物对淡水养殖鱼类常见病的病原菌均有较强的抑菌作用;但大量试验<sup>[7-10]</sup>证明喹诺酮类药物可引发消化系统、神经系统肝肾功能等脏器损害及过敏等不良反应。近年来,为系统评价甲壳动物的免

**基金项目:**安徽省教育厅自然科学研究一般项目(编号: KJ2014B186);宿州学院特色种植业苗种生产工程技术研究中心开放课题(编号:2012YKF30)

**作者简介:**王海潮(1977—),男,宿州学院讲师,硕士。

E-mail: wanghc0823@163.com

**收稿日期:**2015-08-07

疫水平,研究人员<sup>[11-14]</sup>先后采用了各种血清酶指标,其中应用较多的有酚氧化酶(PO)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、碱性磷酸酶(ALP)、溶菌酶(LSZ)等。研究<sup>[15-17]</sup>表明喹诺酮类药物可影响动物免疫力,在低剂量时还对机体免疫系统有促进作用,增强机体免疫功能,增进机体对病原体的吞噬力;巩华等<sup>[18]</sup>通过投喂恩诺沙星对鲤鱼血清酶的影响,发现高浓度药物(1 g/kg)对鲤鱼肝、肾有明显影响。关于抗生素对免疫的影响,除产生免疫抑制外,近年来对部分抗生素的免疫促进作用有较多报道<sup>[19]</sup>。张丽敏等<sup>[20]</sup>报道恩诺沙星以20 mg/kg腹腔注射红笛鲷,明显提高红笛鲷血清中抗体IgM的含量,这种作用可持续3周左右,表明恩诺沙星对鱼类体液免疫有良好的促进作用。王海潮等<sup>[21]</sup>研究过常用抗菌药物对锯缘青蟹体外血清酚氧化酶的影响,但喹诺酮类药物对中华绒螯蟹的体内血清酶的免疫影响未见相关报道。本研究拟以中华绒螯蟹为试验对象,研究3种喹诺酮类药物诺氟沙星、氧氟沙星和恩诺沙星对中华绒螯蟹血清酚氧化酶(PO)、过氧化物酶(POD)、碱性磷酸酶(ALP)、溶菌酶(LSZ)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷草转氨酶(AST)和谷丙转氨酶(ALT)等活力指标的影响,旨在为中华绒螯蟹养殖生产中合理用药提供科学依据,并为进一步研究渔用药物的作用机理提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验动物

中华绒螯蟹:体质量为(150±30) g,安徽宿州某养殖场提供。选择体色好、步足健全、无外伤的个体,随机分成4组,每组18只,暂养于48 cm×37 cm×29 cm塑料箱中,试验期间水温(23±2)℃,盐度19.5‰。

### 1.2 仪器与试剂

酶标仪:VersaMax型,美国Molecular Devices Corporation(MDC)公司;

可见分光光度计:751型,上海分析仪器厂;

3,4-二羟苯丙氨酸(L-3,4-dihydroxyp henylalamine, L-DOPA):分析纯,美国Sigma公司;

溶壁微球菌AS1.635(*Micrococcus lysolei* AS1.635)冻干粉:生物试剂,中国科学院微生物研究所菌种保藏中心;

抗菌药诺氟沙星、氧氟沙星和恩诺沙星:针剂,质量分数均为99%,东北制药厂(GMP兽药认证公司);

SOD、AST和ALT测定试剂盒:南京建成生物工程研究所;

其余试剂:均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

### 1.3 试验方法

1.3.1 抗菌药物的注射 取注射用无菌诺氟沙星、氧氟沙星、恩诺沙星针剂,用无菌生理盐水稀释到3.75 mg/mL。酒精棉球消毒中华绒螯蟹步足基部后,注射约0.2 mL药液,使中华绒螯蟹注射量为5 mg/kg体质量(为常规疾病治疗剂量)。每组注射18只中华绒螯蟹,对照组注射无菌生理盐水。

1.3.2 血清的制备 注射药液组分别于注射后6,12,24,48,72,96 h随机取6只中华绒螯蟹,抽取血淋巴(在第四步足与背面交界处),在4℃下以8 000 r/min离心5 min,吸取上清液,-20℃冰箱保存备用。

1.3.3 酚氧化酶(PO)活力的测定 根据文献<sup>[22]</sup>修改如下:在96孔酶标板中进行反应,反应孔中加入0.2 mol/L pH 7.0磷酸盐缓冲液(PB)170 μL,10 μL注射抗菌药物的待测中华绒螯蟹血清,充分混合后37℃保温15 min,再加入0.6 mg/mL L-DOPA 20 μL,立即放入MD VersaMax酶标仪中,振荡混匀后,每隔5 min读取490 nm处吸光值,反应15 min;以每分钟OD<sub>490</sub>增加0.001作为1个酶活力单位(U)。对照组用生理盐水。

1.3.4 过氧化物酶(POD)活力的测定 根据文献<sup>[23]</sup>修改如下:以邻苯二胺为底物,在96孔酶标板中加入20 μL血清,再加入180 μL显色缓冲液(C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>·H<sub>2</sub>O 7.3 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 11.86 g,双蒸水定容至1 000 mL),置于酶标仪中,测490 nm处的OD值(A<sub>3</sub>);向样品中加入邻苯二胺4 mg,30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4 μL,10 mL显色缓冲液配置的显色液20 μL,待摇匀后,显色15 min,测490 nm处的OD值(A<sub>4</sub>)。POD相对活力以A<sub>POD</sub>=A<sub>4</sub>-A<sub>3</sub>表示。

1.3.5 碱性磷酸酶(ALP)活力的测定 根据文献<sup>[24]</sup>修改如下:取血清200 μL,加入800 μL pH 8.8的Tris-HCl缓冲液(加入Tris碱121.1 g,浓盐酸70 mL,用双蒸水定容到1 000 mL),于37℃水浴10 min,然后加入5 mmol/L的底物50 μL,反应10 min,加入0.1 mol/L NaOH溶液4 mL终止反应,生成的对硝基酚在400 nm处测定。空白是将血清换为双蒸水。以每分钟吸光值上升0.01为一个活力单位。

1.3.6 血清溶菌酶(LSZ)活力的测定 根据文献<sup>[25]</sup>修改如下:以溶壁微球菌冻干粉为底物,溶于0.1 mol/L pH 6.4的磷酸钾盐缓冲液中,调整菌悬液的OD值(OD<sub>570</sub>=0.3),在冰浴中加入3 mL菌悬液于小试管内,再加入50 μL待测血清,混匀,立即在570 nm下测其OD值,后将试管移入37℃水浴中反应30 min,取出,迅速在冰浴中终止反应,测其OD值。溶菌活力按式(1)计算:

$$U = \frac{A_1 - A_2}{A_2} \quad (1)$$

式中:

U——血清溶菌酶(LSZ)活力,U;

A<sub>1</sub>——待测血清反应前的OD值;

A<sub>2</sub>——待测血清反应后的OD值。

1.3.7 其他酶指标的活力测定 血清超氧化物歧化酶(SOD)、谷草转氨酶(AST)和谷丙转氨酶(ALT)活力的测定均采用南京建成生物工程研究所试剂盒,按试剂盒操作说明书进行。上述测定均用751分光光度计进行读数。

### 1.4 数据统计分析

采用Excel 2013软件处理数据和绘图,用SPSS (statistical package for the social science) 13.0对数据进行方差分析,当差异显著(P<0.05)时,用LSD检验法进行均值间多重比较分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 喹诺酮类对酚氧化酶(PO)活力的影响

注射诺氟沙星等 3 种喹诺酮类抗菌药后,中华绒螯蟹体内 PO 活力在短期内出现上升,在 6~12 h 达到最大值,此后逐渐减小;注射生理盐水的对照组 PO 活力基本稳定,后期酶活力略有下降;恩诺沙星对 PO 的活力增高最为明显,6 h 时的 PO 活力较对照组升高 73.44%,差异极显著( $P < 0.01$ );96 h 后,PO 活力下降至与对照组基本相同。上述结果初步表明,3 种药物注射后可使中华绒螯蟹的 PO 活力得到提高,其中以恩诺沙星的影响最为明显(图 1)。王海潮等<sup>[16]</sup>研究喹诺酮类抗菌药物对锯缘青蟹 PO 的体外试验表明,低浓度时表现为增强作用,与本试验结果一致。

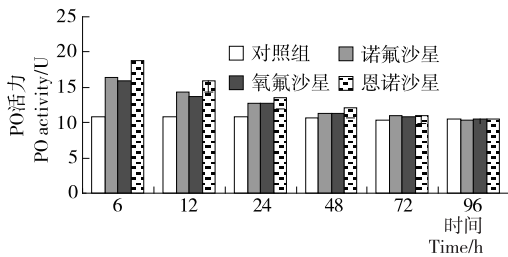


图 1 喹诺酮类药物对中华绒螯蟹血清 PO 活力的影响

Figure 1 Effects of quinolones on the PO activity of serum of *Eriocheir sinensis*

### 2.2 喹诺酮类对过氧化物酶(POD)活力的影响

由图 2 可知,中华绒螯蟹体内 POD 活力在短期内出现上升,在 6~12 h 达到最大值,此后逐渐减小;注射盐水的对照组 POD 活力基本稳定,后期酶活力略有下降;POD 活力在 6~12 h 时达最大值,诺氟沙星、氧氟沙星和恩诺沙星组的 POD 活力分别比对照组升高 34.53%,26.62%,39.18%,差异显著( $P < 0.05$ );96 h 后,POD 活力下降至与对照组基本相同。3 种药物注射后可使中华绒螯蟹 POD 活力得到提高,其中以恩诺沙星的影响最为明显。过氧化物酶是一类含辅基铁卟啉的酶类,主要作用为清除细胞生理代谢过程中的活性氧,减少其对正常细胞的损伤,提高机体的解毒免疫功能和防病抗病能力<sup>[14]</sup>,是机体解毒免疫功能和防病抗病能力的重要指标之一。本试验 POD 活力增加,表明喹诺酮类药物可以增强机体的免疫功能和抗病能力。

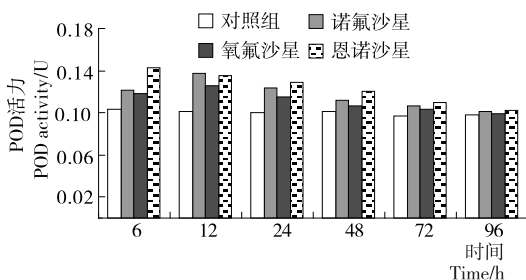


图 2 喹诺酮类药物对中华绒螯蟹血清 POD 活力的影响

Figure 2 Effects of quinolones on the POD activity of serum of *Eriocheir sinensis*

### 2.3 喹诺酮类对碱性磷酸酶(ALP)的影响

中华绒螯蟹注射药物后,短期内 ALP 活力有明显升高,ALP 活力在 48 h 升至较高水平,与对照组有显著差异( $P < 0.05$ );随后逐渐降低,至 96 h 时注射不同药物组 ALP 降至与对照相同水平,对照组酶活力未出现相应变化。结果表明:中华绒螯蟹注射药物后 ALP 活力升高,3 种抗菌药物对中华绒螯蟹 ALP 的影响程度为恩诺沙星>诺氟沙星>氧氟沙星(图 3)。碱性磷酸酶可修饰改变细菌表面结构使其更易为机体识别,加快免疫系统对异物的识别、吞噬和清除,为免疫的常规指标酶类之一。ALP 活力明显升高,表明免疫系统对异物识别的结果。

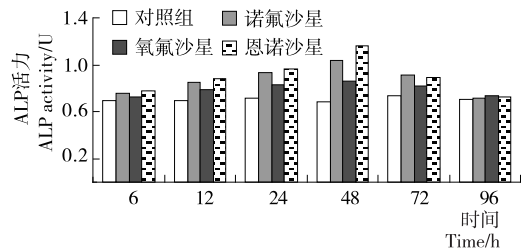


图 3 喹诺酮类药物对中华绒螯蟹血清 ALP 活力的影响

Figure 3 Effects of quinolones on the ALP activity of serum of *Eriocheir sinensis*

### 2.4 喹诺酮类对溶菌(LSZ)活力的影响

注射后,可出现血清溶菌活力升高,溶菌活力在 24 h 时升至最大值,比对照组溶菌酶活力提高 44.27%~79.56%,呈显著差异( $P < 0.05$ ),随后下降,96 h 降至与对照组相同水平,对照组整个试验期间溶菌水平无明显变化(图 4)。表明注射药物可使中华绒螯蟹血清溶菌水平提高,以恩诺沙星最为明显,其次依次为诺氟沙星和氧氟沙星。溶菌酶是一种专门作用于微生物细胞壁的水解酶,破坏和消除侵入体内的异物,在机体防御中起重要的作用<sup>[26]</sup>,是甲壳动物重要的体液非特异性免疫因子。多种免疫增强剂可增强甲壳动物溶菌酶活力,提高机体抗病能力<sup>[14]</sup>。本试验注射喹诺酮类药物后,出现血清溶菌活力升高,证实可以提高机体抗病能力。

### 2.5 喹诺酮类对超氧化物歧化酶(SOD)的影响

注射药物后,短期内超氧化物歧化酶(SOD)活力有明显升高,SOD 活力在 6~12 h 时升至较高水平,与对照组有显著差异( $P < 0.05$ );随后逐渐降低,至 96 h 时注射不同药物组

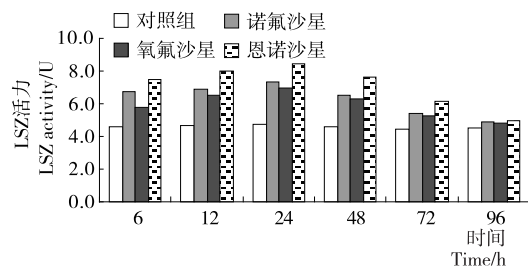


图 4 喹诺酮类药物对中华绒螯蟹血清 LSZ 活力的影响

Figure 4 Effects of quinolones on the LSZ activity of serum of *Eriocheir sinensis*

的 SOD 降至与对照相同水平, 对照组酶活力未出现相应变化。结果表明: 中华绒螯蟹注射药物后促进了 SOD 活力的升高, 恩诺沙星对中华绒螯蟹的血清 SOD 的影响最显著 (图 5)。SOD 活性与生物免疫水平密切相关, 可作为机体非特异性免疫力的重要评判指标<sup>[27]</sup>。多糖、灭活菌体、壳聚多糖、中药等通过注射和口服方式可显著增强河蟹的 SOD 活力<sup>[28]</sup>, 与本试验注射药物后 SOD 活力升高的结果一致。

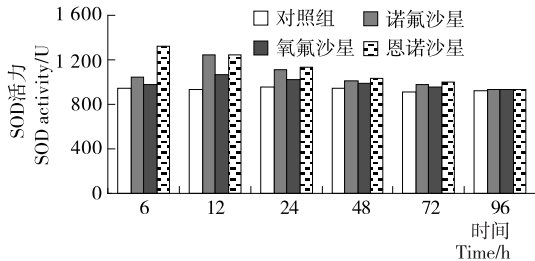


图 5 喹诺酮类药物对中华绒螯蟹血清 SOD 活力的影响  
Figure 5 Effects of quinolones on the SOD activity of serum of *Eriocheir sinensis*

2.6 喹诺酮类对中华绒螯蟹血清谷草转氨酶 (AST) 的影响

由图 6 可知, 注射药物及生理盐水 12 h 内, 中华绒螯蟹血清 AST 活力均降低, 24 h 后转趋于平稳。比较 24~96 h 的转氨酶水平差异, 发现注射药物各组的血清 AST 均低于对照组。血清转氨酶水平主要用于评价脏器受损情况, 存在于胞内, 是组织病变、中毒脏器大面积损伤的重要指标, 潘鲁青等<sup>[29,30]</sup>研究重金属对凡纳滨对虾和锯缘青蟹毒性时发现,  $Cu^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$  和  $Cd^{2+}$  经 24 h 作用, 可使凡纳滨对虾和青蟹血清转氨酶活力升高, 而肝胰腺、鳃丝和肌的酶活力随之降低, 表明相关酶随组织损伤逸出脏器。本试验中血清 AST 均低于对照组, 表明在常规使用剂量下, 药物未对中华绒螯蟹产生内脏器官的明显损伤。

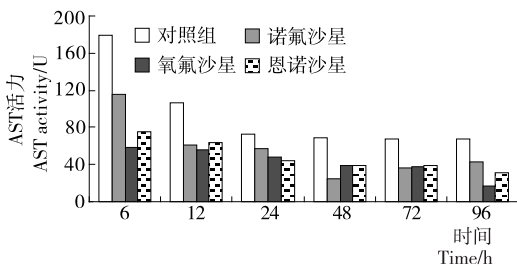


图 6 喹诺酮类药物对中华绒螯蟹血清 AST 活力的影响  
Figure 6 Effects of quinolones on the AST activity of serum of *Eriocheir sinensis*

2.7 喹诺酮类对谷丙转氨酶 (ALT) 的影响

由图 7 可知, 注射药物及生理盐水 12 h 内, 中华绒螯蟹血清 ALT 降低趋势明显, 24 h 后转氨酶指标趋于平稳。试验期间注射药物各组血清 ALT 均低于对照组。表明在常规使用剂量下, 药物未对中华绒螯蟹内脏器官产生明显的损伤。本试验中药物及生理盐水注射组均出现了血清转氨酶指标急剧升高, 随后降低的现象, 表明转氨酶指标可随注射刺激出现较大波动, 可能与注射刺激有关。

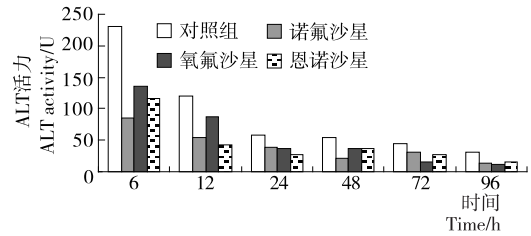


图 7 喹诺酮类药物对中华绒螯蟹血清 ALT 活力的影响  
Figure 7 Effects of quinolones on the ALT activity of serum of *Eriocheir sinensis*

3 结论

在 5 mg/kg 肌肉注射后, 中华绒螯蟹血清 PO、LSZ、POD、ALP 和 SOD 6~24 h 均有不同程度的提高, 但这种促进作用不能持久, 在 48~96 h 后基本回落至与对照相同水平。对照组相关酶指标在试验过程中基本保持稳定, 这种短效免疫增强作用的产生机制以及对中华绒螯蟹健康的影响, 有待于今后进一步研究。本试验还发现, 恩诺沙星对中华绒螯蟹血清 PO、LSZ、POD、ALP 和 SOD 等酶的影响均较诺氟沙星和氧氟沙星显著, 可能与恩诺沙星代谢缓慢残留在机体时间较长有关, 相关机理正在进一步研究之中。

对青蟹酚氧化酶体外试验结果表明, 高浓度 (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的喹诺酮类药物对 PO 有明显抑制作用, 药物浓度为 5~10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时 (常规使用剂量), 对青蟹 PO 无明显影响。本试验是在体外试验的基础上, 以正常给药剂量 (5 mg/kg) 用药, 未出现抑制现象, 表明正常用药对机体健康影响不大, 低剂量给药, 还可以提高中华绒螯蟹的免疫机能。

参考文献

- 1 孙金辉, 孙敬锋, 朱广奇, 等. 中草药添加剂对中华绒螯蟹生长及生化指标的影响[J]. 饲料工业, 2012, 33(16): 18~21.
- 2 Dalsgaard I, Bjerregaard J. Enrofloxacin as an antibiotic in fish [J]. Acta vet Scand, 2011(87): 300~302.
- 3 Williams P J, Lightner D V, Bell T A, et al. Use of enrofloxacin to control atypical *Aeromonas salmonicida* in Atlantic salmon[J]. J. Aquat Anim Health, 2007, 28(9): 216~222.
- 4 张雅斌, 张祚新, 郑伟, 等. 诺氟沙星在鱼类细菌性疾病中的应用研究[J]. 大连水产学院学报, 2010, 15(2): 79~85.
- 5 范红结, 黄国庆, 郭爱珍, 等. 雷氏普罗威登菌引致中华鳖脏器脓肿[J]. 南京农业大学学报, 2011, 24(4): 71~74.
- 6 张雅斌, 刘艳辉, 张祚新, 等. 恩诺沙星在鲤体内的药效学及药动力学研究[J]. 大连水产学院学报, 2014, 19(4): 239~242.
- 7 杨先乐, 陆承平, 战文斌, 等. 新编渔药手册[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 208~209.
- 8 崔建新, 刘玉荣. 5 种喹诺酮类药物急性毒性实验[J]. 中国医院学杂志, 2011, 21(11): 680~684.
- 9 李巧荣. 国产氧氟沙星注射液急性毒性及刺激性试验[J]. 四川生理学杂志, 2011, 33(1): 122~126.
- 10 刘运振, 刘彬, 俞进, 等. 喹诺酮类药物的毒性研究概况[J]. 河南畜牧兽医, 2010, 21(7): 9~11.

(下转第 58 页)

- proaches to quantify *Staphylococcus aureus* cells by real-time quantitative PCR and application of this technique for examination of cheese [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67: 3 122~3 126.
- 12 Palomares C, Torres M J, Torres A, et al. Rapid detection and identification of *Staphylococcus aureus* from blood culture specimens using real-time fluorescence PCR[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2003, 45: 183~189.
  - 13 Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(12): E63.
  - 14 Mori Y, Nagamine K, Tomita N, et al. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 289: 150~154.
  - 15 Shi Xian-ming, Long Fei, Suo Biao. Molecular methods for the detection and characterization of food-borne pathogens[J]. *Pure Appl Chem.*, 2010, 82: 69~79.
  - 16 Mohammadali S, Minhaz U A, Andy N. High-throughput real-time electrochemical monitoring of LAMP for pathogenic bacteria detection [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014, 58: 101~106.
  - 17 Zhao Xi-hong, Li Yan-mei, Wang Li, et al. Development and application of a loop-mediated isothermal amplification method on rapid detection *Escherichia coli* O157 strains from food samples[J]. *Mol. Biol. Rep*, 2010, 37: 2 183~2 188.
  - 18 Ueda S, Kuwabara Y. The rapid detection of *Salmonella* from food samples by loop-mediated isothermal amplification (LAMP)[J]. *Biocontrol Sci.*, 2009, 14: 73~76.
  - 19 Ohtsuka M, Yanagawa K, Takatori K. Detection of *Salmonella Enterica* in naturally contaminated liquid eggs by loop-mediated isothermal amplification, and characterization of *Salmonella* isolates[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71: 6 730~6 735.
  - 20 Chen Si-yi, Ge Bei-lei. Development of a toxR-based loop-mediated isothermal amplification assay for detecting *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *BMC Microbiol*, 2010, 10: 41~45.
  - 21 Yamazaki W, Kumeda Y, Misawa N, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of the *tdh* and *trh* genes of *Vibrio parahaemolyticus* and related *Vibrio* species [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76: 820~828.
  - 22 Zhao Xi-hong, Wang Li, Li Yan-mei, et al. Development and application of a loop-mediated isothermal amplification method on rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa* strains[J]. *World J. Microbiol Biotechnol*, 2011, 27: 181~184.
  - 23 Wang Li, Li Yue, Chu Jin, et al. Development and application of a simple loop-mediated isothermal amplification method on rapid detection of *Listeria monocytogenes* strains[J]. *Mol. Biol. Rep*, 2012, 39: 445~449.
  - 24 张淑红, 吴清平, 徐晓可, 等. LAMP 法在阪崎肠杆菌快速检测中的应用[J]. *食品与机械*, 2011, 27(5): 111~114.
  - 25 Goto M, Honda E, Ogura A, et al. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue[J]. *Biotechniques*, 2009, 46(3): 167~172.
  - 26 Wang Xin-ru, Wu Li-fen, Wang yan, et al. Rapid detection of *Staphylococcus aureus* by loop-mediated isothermal amplification [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2015, 175(2): 882~291.

(上接第 46 页)

- 11 王雷. 中国对虾病害的免疫防治研究[M]. 北京: 中国科学院海洋研究所, 1993.
- 12 姚翠鸾, 王维娜, 王安利. 水生动物体内超氧化物歧化酶的研究进展[J]. *海洋科学*, 2003, 27(10): 18~21.
- 13 陈国福, 宋晓玲, 黄健, 等. A3tt-肽聚糖对凡纳滨对虾磷酸酶及细胞内酚氧化酶活性的影响[J]. *海洋水产研究*, 2007, 28(1): 59~64.
- 14 刘树青, 江晓路, 牟海津, 等. 免疫多糖对中国对虾血清溶菌酶, 磷酸酶和过氧化物酶的作用[J]. *海洋与湖沼*, 2009, 30(3): 278~280.
- 15 Sonstein S A. Effect of low concentrations of quinolone antibiotics on bacterial virulence mechanisms[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2013, 16(4): 277~232.
- 16 张慧芳, 李嗣英, 林赴田. 喹诺酮类抗生素的免疫调节作用研究进展[J]. *国外医药抗生素分册*, 2013, 24(4): 145~149.
- 17 黄静, 张天托. 氟喹诺酮类抗生素免疫调节分子机制研究进展[J]. *国外医药抗生素分册*, 2006, 27(5): 211~215.
- 18 巩华, 李华, 于毅, 等. 恩诺沙星对鲤酯酶同工酶和血清生理生化指标的影响[J]. *大连水产学院学报*, 2005, 20(1): 29~33.
- 19 李真. 抗生素的免疫调节作用[J]. *国外医药(抗生素分册)*, 2007(9): 384~385.
- 20 张丽敏, 吴灶和, 简纪常, 等. 腹腔注射恩诺沙星和氟苯尼考对红笛鲷血清 IgM 含量的影响[J]. *广东海洋大学学报*, 2009, 29(3): 33~38.
- 21 王海潮, 赵海泉, 钱冬, 等. 水产常用抗菌药物对锯缘青蟹酚氧化酶的影响[J]. *水产科学*, 2011, 30(1): 38~42.
- 22 Ashida M. Purification and characterization of pre-phenoloxidase from hemolymph of the silkworm *Bombyx mori* [J]. *Archives Biochem. Biophys*, 1971(44): 749~762.
- 23 史成银, 黄健, 宋晓玲. 对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒单克隆抗体的 ELISA 快速检测 [J]. *中国水产科学*, 2009, 6(3): 116~118.
- 24 艾春香, 陈立侨, 高露姣, 等. Vc 对中华绒螯蟹血清和组织中超氧化物歧化酶及磷酸酶活性的影响[J]. *台湾海峡*, 2012, 21(4): 431~438.
- 25 Hultmark. Insect immunity: Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora Cecropic*[J]. *Insect Immune*, 2004(10): 136~145.
- 26 李光, 樊景凤, 林凤翔, 等. 对虾的免疫机制及其疾病免疫预防的研究进展[J]. *水产科学*, 2007, 26(1): 56~59.
- 27 李光友. 中国对虾疾病与免疫机制[J]. *海洋科学*, 2005, 16(4): 1~3.
- 28 沈锦玉, 刘问, 曹铮, 等. 免疫增强剂对中华绒螯蟹免疫功能的影响[J]. *浙江农业学报*, 2004, 16(1): 25~29.
- 29 潘鲁青, 吴众望, 张红霞. 重金属离子对凡纳滨对虾组织转氨酶活力的影响[J]. *中国海洋大学学报*, 2005, 35(2): 195~198.
- 30 汤湾, 李少菁, 王桂忠, 等. 铜、锌、镉对锯缘青蟹仔蟹代谢酶活力影响的实验研究[J]. *厦门大学学报*, 2010, 39(4): 521~525.