论文

促生长剂喹乙醇诱导斑马鱼消化道菌群失衡增加病原菌感染风险研究

何凤旭, 王全民, 李舒宁, 冉超, 郭小泽, 张震, 周志刚*

中国农业科学院饲料研究所, 农业部饲料生物技术重点实验室, 北京 100081

* 联系人, E-mail: zhouzhigang03@caas.cn

收稿日期: 2017-04-17; 接受日期: 2017-05-09; 网络版发表日期: 2017-07-10

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2015CB150605)、国家自然科学基金(批准号: 31272672, 31572633)、北京冷水鱼创新团队(批准号: SCGWZJ 20161104-4)和中央级公益性科研院所基本科研业务(批准号: 1610382016013)资助

摘要 畜禽和水产养殖业, 低剂量的抗生素被广泛地用作促生长剂. 畜禽中, 低剂量抗生素的应用可降低病原菌感染, 而水产中的应用却增加了患病风险, 而抗生素在水产中应用经验总结尚未在实验室条件得到验证. 本研究通过低剂量的喹乙醇促生长作用建立斑马鱼(*Danio rerio*)易感染模型. 喹乙醇饲喂斑马鱼2周后显著地改变消化道菌群, 优势菌由鲸杆菌变为肠杆菌. 此外, 喹乙醇还抑制斑马鱼的炎症因子($P<0.05$). 进一步通过无菌斑马鱼模型, 分别采用喹乙醇直接浸浴和菌群转接方式证明喹乙醇的作用方式, 结果表明喹乙醇(直接)和转接后的菌群(间接)均可显著抑制斑马鱼的炎症因子($P<0.05$), 而抗病力下降则主要是由喹乙醇通过改变消化道微生物菌群进行介导. 总之, 本研究结果表明低剂量的喹乙醇诱导斑马鱼消化道菌群失衡导致抗病力下降.

关键词 促生长剂抗生素, 抗病力下降, 消化道菌群, 喹乙醇

近60年来, 低剂量的抗生素被当作促生长剂广泛地应用在畜禽养殖上^[1-3]. 在水产养殖领域, 抗生素也被证实具有促进水产动物生长和改善饲料利用率的作用^[1,4]. 随着抗生素耐药性危害人类健康认识的不断深入, 欧盟和美国先后发布了抗生素在养殖动物上的使用禁令^[5]. 由于抗生素成本低和促生长效应, 尽管政府层面明令禁止, 但是一些企业或个人滥用抗生素现象仍屡禁不止^[6]. 目前中国已成为世界第一水产养殖大国, 其产量占世界水产养殖总量的70%左右^[7]. 自2002年, 我国也成为最大的水产品出口国^[8]. 虽然我国政府自2013年已颁布禁令禁止抗生素在水产养殖

中使用, 但滥用现象仍频发. 我国水产用抗生素年用量约为10000 t/年^[9], 这在一定程度上反映了抗生素滥用危害仍未引起大家的足够重视.

动物消化道内定殖着大量的微生物, 这些微生物发挥着维护宿主免疫和对抗病原菌的作用^[10-12]. 研究表明, 治疗剂量的抗生素在哺乳动物中的使用会干扰宿主的消化道菌群, 进而导致宿主更易被病原菌感染^[12,13]. 尽管在猪(*Sus scrofa domestica*)^[14]和小鼠(*Mus musculus*)^[15,16]中都有报道作为低剂量添加剂使用的抗生素也能够诱导宿主消化道微生物的改变, 但是其诱导的菌群结构改变是否会降低宿主的抗病力尚未得

引用格式: 何凤旭, 王全民, 李舒宁, 等. 促生长剂喹乙醇诱导斑马鱼消化道菌群失衡增加病原菌感染风险研究. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 708-717, doi: [10.1360/N052017-00131](https://engine.scichina.com/doi/10.1360/N052017-00131)
英文版见: He S X, Wang Q M, Li S N, et al. Antibiotic growth promoter olaquinox increases pathogen susceptibility in fish by inducing gut microbiota dysbiosis. Sci China Life Sci, 2017, in press, doi: [10.1007/s11427-016-9072-6](https://engine.scichina.com/doi/10.1007/s11427-016-9072-6)

到研究. 在畜禽养殖中低剂量的抗生素可降低病原菌的感染, 这也被认为是其促生长作用的机理之一^[17]. 与这一观点吻合的现象是促生长用抗生素在欧盟被禁用后畜禽养殖的患病率和治疗用抗生素使用都显著增长^[1,5]. 水产养殖中的情况与畜禽不同, 在水产养殖中促生长抗生素的使用往往伴随水产动物疾病的暴发, 引起更高的死亡率^[18]. 然而这些现象只是在生产实践中的经验总结, 尚未在实验室条件下得到模拟和验证, 其机理是否涉及抗生素诱导的肠道菌群改变也不清晰.

喹乙醇是1,4-二氧喹啉衍生物, 又被称为快育灵, 它具有良好的广谱抗菌效果, 尤其是对大肠杆菌、沙门氏杆菌等革兰氏阴性致病菌所致的消化道疾病具有良好的疗效^[19]. 在水产养殖中, 喹乙醇能促进动物对饲料的消化利用, 提高生长速度等, 因而被广泛地使用^[4]. 本研究以模式动物斑马鱼(*Danio rerio*)为研究对象, 验证了促生长剂量的喹乙醇增加斑马鱼感染风险的表型, 在此基础上通过无菌斑马鱼菌群转接模型揭示喹乙醇诱导肠道菌群失衡导致其抗病力下降的作用机理.

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

本实验中所用斑马鱼为AB系. 斑马鱼的饲养和相关实验均严格按照《北京市实验动物管理条例》的标准及中国农业科学院饲料研究所在实验动物伦理与使用委员会的指导(2015-ZZG-ZF-011).

实验1. 1月龄斑马鱼随机分配至5个处理组(CON, 0 mg/kg喹乙醇; T1, 50 mg/kg喹乙醇; T2, 100 mg/kg喹乙醇; T3, 150 mg/kg喹乙醇; T4, 200 mg/kg喹乙醇, 网络版附表1), 10 L养殖缸放置体格均匀的18尾鱼, 每个处理组设4个重复. 饲料原料经超细粉碎, 过100目筛, 按配比进行均匀混合, 用小型制料机制粒, 自然风干后再经小型粉料机粉碎后过60目筛获得粒径约为1-mm²左右的饲料颗粒, 于-20℃冻存.

斑马鱼每天于9:30和15:30按初始体重的6%进行投喂, 投喂量每2天进行上调, 饲喂周期28天. 在投喂时, 关闭自动循环水系统, 待鱼采食完后再开启. 每周更换30%的养殖水. 在饲养第0, 14和28天时分别进

行称重, 在第14和28天进行病原菌攻毒实验. 养殖过程, 循环水经生物膜过滤和净化并曝气处理, 温度控制在28℃±1℃, pH 7.5–7.8; 氨氮<0.50 mg/NL; 亚硝酸盐<0.02 mg/NL, DO>5.0 mg/OL; 光照周期为14:10(白天: 夜间), 光照强度9 mm直径日光灯, 强度为20 μW/cm².

实验2. 根据实验1预试结果, 进一步选择150 mg/kg喹乙醇处理组进行后续14天的养殖实验. 1月龄斑马鱼随机分配到两个处理组, CON: 0 mg/kg喹乙醇和T: 150 mg/kg喹乙醇, 10 L养殖缸放置18尾鱼. 实验过程参照实验1进行, 第14天最后一顿饲喂6 h后进行取样工作(网络版附图1), 取样过程斑马鱼经冰水麻醉处理, 无菌条件下剖取完整肠道, 并去除内容物, 加入1 mL RNA later(Qiagen, 美国)保存于-80℃待后续基因表达水平分析.

1.2 抗感染力评估

嗜水气单胞菌ZJB-1(中国水科院珠江所馈赠), 在TSB培养基中28℃过夜活化. 将活化的菌加入攻毒缸中使其浓度达到10⁷ CFU/mL, 每缸放置10尾鱼, 每个处理设4个平行, 每12 h记录死鱼情况. 另外单独设置取样处理组, 分别在攻毒后的6, 12和24 h取肾脏样本, 每个时间点取6尾/处理组. 感染肾脏的病原菌数量进行10倍梯度稀释涂布于含100 mg/mL的TSA板上, 28℃过夜培养并统计病原菌数.

1.3 肾脏ROS活性检测

斑马鱼经4 mg/mL三卡因(Sigma, 美国)安乐致死, 取出完整肾脏. ROS活性检测参照^[20]方法, 具体操作如下: 肾脏转移到96孔板中, 加入100 μL Dulbecco's改良液/F-12(50% DMEM, 50% F-12, 无酚红; Gibco BRL, Life Technologies, 美国). 在28℃孵育30 min后, 每孔加入100 μL 1 μg/mL H2DCFDA (Molecular Probes, 美国)含0.4% DMSO和400 ng/mL PMA (Molecular Probes)进行刺激. 反应2 h后在485和530 nm处检测荧光强度, 以10% DMSO设为基准值.

1.4 消化道微生物菌群分析

每个处理组随机取24尾鱼, 剖取完整肠道, 并用镊子挤出内容物. 为了避免个体间的差异, 12尾鱼的消化内容物(约200 mg)进行混样处理, 每个处理设2个重

复. 细菌基因组用QIAamp DNA Stool Mini Kit(Qiagen)进行提取. DNA样本质量经1%凝胶检测, DNA浓度用NanoDrop ND-2000(Termo Scientific)检测. 样品采用16S rRNA V3-V4区进行扩增^[21]. 多样性宏基因组测序和数据分析由北京奥维森基因科技有限公司完成. 初始数据用QIIME Pipeline-Version 1.7.0(<http://qiime.org/>)进行分析和处理, 去除打分低于20, 碱基模糊, 引物错配或测序长度小于150 bp的序列. 根据barcodes归类各处理组序列信息并在Bacterial SILVA database(SILVA SSU 123)进行比对. 进行Alpha和beta多样性分析、系统发育树构建、多样性指数分析. 热图采用R语言绘制.

1.5 RNA提取和实时定量PCR

肠道样的RNA提取采用TRIzol法(Promega, 德国), cDNA合成用 ReverTra Ace- α -RT-PCR kit (TOYOBO, 上海). PCR反应体系为: 20 μ L: SYBR Green Premix EX Taq TM11(TaKaRa, 北京) 10 μ L, 引物(10 μ mol/L)各0.5 μ L, cDNA 1 μ L, 加用焦碳酸二乙酯处理的水至20 μ L; 反应条件: 预变性95 $^{\circ}$ C 30 s; PCR反应, 95 $^{\circ}$ C 3 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 20 s, 循环40次. 以rps11作为内参, 重复检测3次, 每次设3个平行数据, 通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行分析^[22].

1.6 离体肠道试验

采用体外肠道模型试验评估抗生素处理后肠道病原菌的黏附性和生长能力. 完整的斑马鱼肠道在无菌条件下剖取, 立即放入Dulbecco's改良的培养液中(DMEM; Gibco)含10%胎牛血清(fetal bovine serum, FCS)和0.5% D-甘露糖. 肠道在剪剖镜下用手术刀从中间剖开并去除内容物.

肠道黏附力检测按^[23]方法, 100 μ L *A. hydrophila* ZJB-1(10^8 CFU/mL)吸取到肠道黏膜上, 在28 $^{\circ}$ C孵育30 min. 孵育后用1 $\times$ PBS反复冲洗3次去除未黏附的菌. 然后将组织匀浆并稀释涂板在LB平板上进行培养计数.

A. hydrophila ZJB-1肠道黏膜生长测定按^[23]方法, 肠道按上述方式进行处理, 然后将处理好的肠道浸入1 $\times$ PBS缓冲液中, 在涡旋振荡仪中以5档速率涡旋3 min (Qilinbeier Voatex, Haimen Qilinbeier, 海门)分离肠黏膜. 取2 μ L过夜活化的*A. hydrophila* ZJB-1与200 μ L黏膜分

离液混合在37 $^{\circ}$ C培养12 h. 混合培养液按梯度稀释涂布于LB平板上进行计数.

1.7 无菌斑马鱼制备

无菌斑马鱼制备参照^[24]方法进行. 受精后6 h的胚胎浸入0.1% polyvinyl pyrrolidoneiodine(Sigma)中处理2 min, 随后立即用GZM缓冲液清洗3次. 胚胎用0.003%次氯酸钠水溶液中漂白10 min再用GZM进行漂洗, 所制备的为无菌斑马鱼胚胎, 在28 $^{\circ}$ C无菌条件下培养72 h, 获得无菌斑马鱼.

1.8 无菌斑马鱼菌群转接验证

斑马鱼饲喂2周后, 在无菌条件下取样后肠内容物菌, 将6尾鱼收集的内容物进行混样处理溶于1 mL PBS. 悬浮菌液按 10^6 CFU/mL水平添加到3 dpf的无菌斑马鱼GZM中, 添加的菌体水平通过LB(有氧培养)和BHI(厌氧培养)于28 $^{\circ}$ C培养24 h计数确定. 无菌斑马鱼菌群转接处理组设置如下: GF(无菌斑马鱼组); CK(转接对照处理组菌群); T(转接喹乙醇处理组菌群). 每个处理组设12个重复10尾幼鱼. 加菌处理3天后, 其中的8个平行处理取样后加入1 mL TRIzol 冻存于-80 $^{\circ}$ C. 总RNA提取按上述方法, 半定量 RT-PCR分析相关免疫因子的表达水平(网络版附表2). 余下的4个平行样本进行病原菌*A. hydrophila* ZJB-1攻毒处理.

1.9 无菌斑马鱼喹乙醇直接作用验证

喹乙醇按终浓度0, 1, 10和100 μ g/L直接加入GZM中, 处理3-dpf GF斑马鱼, 每个处理设6个重复, 每个平行样有30尾幼鱼. 处理3天后, 用*A. hydrophila* ZJB-1进行攻毒统计免疫保护率.

1.10 幼鱼呼吸爆发活性测定

经菌群转接或喹乙醇直接浸浴作用后的6 dpf斑马鱼幼鱼进行ROS活性检测. 检测方法与上述方法一致^[20], 除所用缓冲液为GZM. 每个处理设6个平行, 并进行重复3次.

1.11 统计分析

数据结果用 $\bar{x} \pm SE$ 表示, 数据采用SPSS 18.0进行统计分析, 多组间数据采用Duncan's multiple range test进行显著性分析, *P*值设为<0.05.

2 结果与分析

2.1 促生长剂喹乙醇导致斑马鱼抗病力下降

经4周养殖,添加150和200 mg/kg喹乙醇处理组的增重显著高于对照组($P<0.05$)(图1A).然而喹乙醇处理组导致*A. hydrophila*攻毒后更高死亡率,尤其是150和200 mg/kg喹乙醇处理($P=0.07$)(图1B).

为了进一步验证该表型,选择150 mg/kg喹乙醇处理组进行2周的饲喂实验.结果表明,150 mg/kg喹乙醇处理组具有明显的促生长效果($P<0.05$)(图1C),而抗病力显著下降($P<0.01$)(图1D).

进一步通过体外肠道模型评估喹乙醇添加对病原菌*A. hydrophila*的黏附和增殖的影响,结果表明,*A. hydrophila*的黏附和增殖数量在喹乙醇处理组均明显高于对照组的($P<0.05$)(图2A和B).此外,攻毒后6, 12和24 h斑马鱼肾脏中的病原菌数量结果表明喹乙醇处理组的均显著高于对照组($P<0.05$)(图2C).

2.2 喹乙醇影响斑马鱼肾脏ROS活性

通过荧光法检测斑马鱼肾脏ROS活性的结果见图3.喹乙醇处理组的ROS活性水平均显著低于

对照组的($P<0.05$)(图3A).对ROS产生的相关因子进行定量分析,*Ndi*和*iNos*的表达水平在喹乙醇处理组均显著低于对照组($P<0.05$)(图3B和C).

2.3 喹乙醇影响斑马鱼肠黏膜免疫

经喹乙醇饲喂2周,肠黏膜免疫因子*Il1β*和*Il10*的表达水平受到显著的抑制($P<0.05$)(图4A和C).促炎因子*Tnfα*和热应激蛋白*Hsp70*的表达水平未受到喹乙醇的影响($P>0.05$)(图4B和D).

2.4 喹乙醇影响斑马鱼消化道微生物

采用16S计数的方法证实喹乙醇处理组显著的降低消化道内的微生物总菌数($P<0.05$)(图5A).进一步通过宏基因组分析表明,喹乙醇处理组的多样性指数也显著的低于对照组的($P<0.05$)(图5E).属水平的热图分析表明,喹乙醇显著改变消化道菌群结构($P<0.05$)(图5B).喹乙醇也会改变消化道内的优势菌群种类,由*Fusobacteria*(对照组)变为*Proteobacteria*(喹乙醇组)(图5C).进一步通过菌群结构的细分,对照组中的优势菌群以*Cetobacterium*为主,而喹乙醇中的绝对优势菌群为*Enterobacter*(图5D).

图1 喹乙醇对斑马鱼生长和抗感染能力的影响

A: 斑马鱼饲喂梯度浓度的喹乙醇28天增重率; B: 斑马鱼饲喂梯度浓度的喹乙醇28天攻毒死亡率; C: 斑马鱼饲喂150 mg/kg喹乙醇14天的增重率; D: 斑马鱼饲喂150 mg/kg喹乙醇14天攻毒死亡率; 星号表示数据统计上存在显著差异. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$

图2 病原菌*A. hydrophila* ZJB-1在斑马鱼组织定植数量

A: 喹乙醇饲喂斑马鱼14天*A. hydrophila*在肠道上黏附数量; B: 喹乙醇饲喂斑马鱼14天*A. hydrophila*在肠道上的增殖能力; C: 攻毒后6, 12和24 h斑马鱼肾脏*A. hydrophila*侵染量; 星号表示数据统计上存在显著差异. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$

图3 肾脏ROS活性和相关基因表达水平

A: 喹乙醇处理组肾脏ROS相对活性; B: 肾脏NADH dehydrogenase subunit (*Ndi*)表达量; C: 肾脏nitric oxide synthase (*iNOS*)表达量. 每个处理组设8个生物学重复, 星号表示数据统计上存在显著差异. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$

2.5 消化道微生物或喹乙醇直接介导斑马鱼的免疫抑制作用

为了验证喹乙醇改变消化道菌群是否引起免疫反应上的差异, 本课题组进行无菌斑马鱼菌群转接实验. 无菌斑马鱼分别转接对照和喹乙醇处理组的消化道菌群进行刺激, 喹乙醇转接的处理组ROS活性显著低于对照组的($P < 0.05$)(图6A). 进一步通过全鱼的炎症反应因子检测, 表明喹乙醇转接处理组诱导的*Saa*(急性蛋白), *Il1 β* , *Il10*和*Il8*(细胞因子)和*Cclc25ab*均显著低于对照组的($P < 0.05$)(网络版附图2). 而*Mpo*(粒性因子特异分子标签)和*Cfb*无显著差异($P > 0.05$)(网络版附图2).

喹乙醇直接作用无菌斑马鱼的结果见图6B. 与对照组相比, 直接添加喹乙醇浸浴无菌斑马鱼也会显著的降低宿主ROS的活力($P < 0.05$)(图6B).

2.6 喹乙醇改变菌群介导斑马鱼抗病力下降

为进一步验证喹乙醇改变消化道菌群是否介导宿主抗病力下降, 本课题组开展无菌斑马鱼菌群转接实验. 经过3天的菌群转接和病原菌攻毒, 喹乙醇菌群转接组的死亡率显著高于对照组($P < 0.05$)(图7A和B).

同样, 采用无菌斑马鱼模型验证喹乙醇的直接作用. 结果表明喹乙醇的直接作用对斑马鱼的抗病能力

图 4 斑马鱼肠黏膜免疫因子Q-PCR检测

A: *Il1 β* ; B: *Tnf α* ; C: *Il10*; D: *Hsp70*; 星号表示数据统计上存在显著差异. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$

图 5 喹乙醇对斑马鱼消化道菌群的影响

A: 消化道微生物总菌数; B: 消化道微生物属水平热图分析; C: 各处理组消化道微生物科水平上相对量; D: *Proteobacteria*属水平微生物种类相对占有比例; E: 消化道微生物多样性指数

图6 喹乙醇菌群转接或直接作用对无菌斑马鱼ROS活性影响

A: 10^6 CFU/mL 菌群转接诱导3天后ROS相对活性; B: 无菌斑马鱼直接作用1, 10和100 μ g/mL喹乙醇3天后ROS相对活性; 每个处理设8个平行样本, 独立重复3次; 星号表示数据统计上存在显著差异. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$

图7 无菌斑马鱼菌群转接和喹乙醇直接作用后*A. hydrophila* ZJB-1攻毒存活率(网络版彩图)

A: 无菌斑马鱼经 10^6 CFU/mL 菌群转接3天后*A. hydrophila* ZJB-1攻毒存活曲线; B: 无菌斑马鱼经 10^6 CFU/mL 菌群转接3天后*A. hydrophila* ZJB-1攻毒存活率; C: 无菌斑马鱼经1, 10和100 CFU/mL喹乙醇作用3天后*A. hydrophila* ZJB-1攻毒存活曲线; D: 无菌斑马鱼经1, 10和100 μ g/mL喹乙醇作用3天后*A. hydrophila* ZJB-1攻毒存活率. 星号表示数据统计上存在显著差异. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$

无影响($P>0.05$)(图7C和D).

2.7 喹乙醇处理组的特征菌诱导较低水平ROS活性

为了进一步验证菌群对斑马鱼免疫保护的贡献作用, 从斑马鱼的消化道内分离到对照组和喹乙醇处理组的特征菌, 用 10^6 CFU/mL浸浴免疫无菌斑马鱼检测ROS活性. 来自对照组中的特征菌*Cetobacterium somerae*和*Aeromonas veronii*诱导的ROS活性显著高于来自喹乙醇中的特征菌*Enterobacter asburiae*和*Enter-*

obacter sp. ($P<0.05$)(图8A). 相应地, 喹乙醇中的特征菌混样返补至对照组显著降低ROS活性; 反之, 对照处理组中的特征菌返补至喹乙醇处理组的菌群能够恢复ROS水平($P<0.05$)(图8B).

3 讨论

近些年, 小鼠中的研究结果表明治疗性抗生素的使用增加宿主细菌性疾病感染机率^[25,26]. 在养殖动物

图8 特征菌转接对无菌斑马鱼ROS活性影响

A: 各处理组分离的单菌转接无菌斑马鱼3天后ROS活性; B: 各处理组分离的特征菌的混合样本回补到无菌斑马鱼刺激ROS活性. 每个处理设8个生物学平行, 独立重复3次. CON: 消化道菌群来自对照组14天样本; T: 消化道菌群来自喹乙醇饲喂14天组; CONm: 分离自对照组的 *Cetobacterium somerae*, *Aeromonas veronii* 和 *Aeromonas jandaai* 混合菌处理(10^6 CFU/mL); Tm: 分离自喹乙醇处理组的 *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter sp.* 和 *Comamonas testosteroni* 混合菌处理(10^6 CFU/mL). 星号表示数据统计上存在显著差异. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$

上, 促生长抗生素能否导致养殖动物更易感染尚未见报道. 在畜禽养殖, 促生长剂抗生素的使用会降低病原菌感染^[17]. 本研究以斑马鱼建立促生长剂喹乙醇的易感染模型. 在水产养殖过程中低剂量促生长剂抗生素的使用往往导致病原菌的感染和较高的死亡率^[27], 这暗示鱼类更易受到低剂量的抗生素影响.

本研究长期添加低剂量的喹乙醇改变斑马鱼消化道菌群结构, 优势菌由 *Enterobacter* 变为 *Cetobacterium*, 另外喹乙醇还会降低消化道菌群多样性和总菌数. 口服抗生素引起老鼠和人的消化道菌群失衡, 降低 Firmicutes 和 Bacteroidetes 丰度, 增加 Enterobacteriaceae 丰度^[28]. 有关抗生素影响宿主消化道菌群, 本研究斑马鱼上的结果与哺乳动物中报道的结果较一致, 抗生素会抑制宿主消化道原有的优势菌群, 特异性的增加 Enterobacteriaceae 量. 小鼠^[15,16,29]和猪^[14]上治疗用抗生素的应用对消化道菌群结构的影响远小于鱼上的, 据此推测由于宿主动物遗传背景的差异导致抗生素对肠道菌群影响上的差异.

在哺乳动物上的研究表明, 改变或消除宿主消化道内的共生菌会影响宿主的免疫防御性能^[12], 还可能导致免疫抑制现象发生. 如低剂量的青霉素降低小鼠肠道免疫相关基因的表达水平^[16]. 促生长剂四环素降

低猪血清戊基A(SAA)蛋白^[30]和肉仔鸡血浆 α_1 -酸糖蛋白表达量^[2], 说明抗生素能够抑制宿主的周身性免疫. Khadem等人^[2]的研究, 进一步证实抗生素能够抑制炎症反应, 如下调空肠 *Il1 β* , *Il10* 和 *iNos* 的表达水平. 免疫细胞的ROS活性代表着宿主的先天性免疫活力^[20]. 长期添加喹乙醇降低斑马鱼肾脏的ROS和相关调控基因的表达水平, 表明喹乙醇抑制斑马鱼先天性免疫. 此外, 喹乙醇还会抑制斑马鱼肠道抗炎因子 *Il1 β* 和 *Il10* 表达量, 而对 *HSP70* 和 *Tnfa* 无影响. 其他动物上的研究也表明, 抗生素会降低宿主的炎症因子表达水平. 环丙沙星下调LPS刺激后的人源单核细胞 *IL-1 α* 和 *Tnfa* 表达水平, 对其他因子 *IL-6*, *IL-10* 和 *IL-12* 无影响^[31]. 不同类型的抗生素对炎症因子的作用差异可能是由于抗生素的杀菌机制上的不同引起. 无菌斑马鱼菌群转接实验结果表明喹乙醇处理组的菌群具有较低水平的ROS诱导活性(图6). 本实验中各处理组中菌群转接浓度一致, 其他所设定条件也一致, 因此推测对照组和喹乙醇处理组菌群转接诱导的ROS活性方面的差异归功于不同的菌群结构. 喹乙醇显著降低消化道微生物总数, 抗生素的干扰总菌数作用可能导致免疫抑制现象^[4,32]. 因此, 喹乙醇既降低消化道微生物总数又能够改变菌群结构, 对宿主的ROS活性的抑制作用加强.

此外, 喹乙醇直接作用无菌斑马鱼会显著地抑制宿主的ROS活性。以上结果表明, 喹乙醇既可通过诱导菌群结构改变又通过自身的直接作用对宿主免疫起到抑制作用, 这种混合作用有待于进一步的研究。

依据无菌斑马鱼模型的研究结果表明, 喹乙醇诱导的消化道菌群改变是导致斑马鱼病原菌感染的主要因素。消化道菌群结构的完整性能有效起到对抗病原菌的作用, 这种作用方式称为“定植排斥”。微生物主要通过竞争营养物质和定植空间形式来抑制病原菌^[33]或产生抑菌成分^[34]进行直接作用。此外, 微生物还可通过间接形式进行定植排斥作用, 如提高宿主的免疫性^[35,36]或产生代谢物提高肠黏膜结构完整^[37]。目前, 菌群的“定植抑制”是一个相对复杂的概念, 还有待于更深入的研究^[13]。本研究还不能够从定植抑制角度解析喹乙醇改变菌群结构方面的机制。喹乙醇可通过直接作用降低宿主ROS活性, 但其直接作用形式对宿主的抗病力无影响, 这可能是由于喹乙醇引起的ROS变化不足以影响到宿主的抗病能力或还可能存在着时间效应。因此, 推测喹乙醇诱导的消化道菌群失衡是导致斑马鱼抗感染力下降的主要因素。

抗生素引起特征菌群的改变是否引起宿主免疫活性的变化? 为了更好地回答这个问题, 通过筛选喹乙醇处理后的特征菌群与对照组的进行比较。喹乙醇处理后的优势菌*Enterobacter*诱导产生的ROS活性

明显低于对照组中的优势菌*Cetobacterium*。此外, 在非绝对优势菌*Comamonas*(喹乙醇处理)vs. *Aeromonas*(对照组), 也得到类似的结论。考虑到*Cetobacterium*和*Enterobacter*分别代表着对照组和喹乙醇处理组中的绝对优势菌群, 宿主抗感染能力下降的原因可能是由于优势菌的变更所引起的。然而, 一些肠道中占比低丰度的某些菌群对宿主的免疫贡献也是很重要的^[38]。在菌群转接过程, 虽然加入水体中的菌群量(10^6 CFU/mL)是一致的, 但是实际能够有效定植到宿主肠道内的菌是否存在着差异, 也需纳入考量范围。目前尚未有菌群在宿主上的定植量影响宿主免疫方面的报道, 后续需进行比较低丰度和高丰度菌定植量与免疫间关系的研究来尝试回答这个问题。活的益生菌或某种微生物的添加被证实可有效地缓解哺乳动物因治疗用抗生素所导致的免疫力下降^[10,12]。基于本研究结果, *Cetobacterium* spp.可做为水产动物潜在的益生菌。如能够进一步的解析*Cetobacterium*提高宿主免疫性背后的分子机制, 对更好地应用该菌或消除肠道失衡菌群所带来的负面作用奠定良好基础。

总之, 本研究结果表明促生长剂喹乙醇诱导斑马鱼肠道菌群失衡导致抗感染力下降。目前, 我国水产养殖中抗生素仍被大量使用, 人们还没有充分认识到抗生素滥用带来的危害。期望通过本研究为水产行业抗生素的全面禁用提供理论依据。

参考文献

- 1 Castanon J I. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. *Poultry Sci*, 2007, 86: 2466–2471
- 2 Khadem A, Soler L, Everaert N, et al. Growth promotion in broilers by both oxytetracycline and *Macleaya cordata* extract is based on their anti-inflammatory properties. *Br J Nutr*, 2014, 112: 1110–1118
- 3 Xiong W, Sun Y, Zhang T, et al. Antibiotics, antibiotic resistance genes, and bacterial community composition in fresh water aquaculture environment in China. *Microb Ecol*, 2015, 70: 425–432
- 4 Li H, Wang W, Mai K, et al. Effect of dietary olaquindox on the growth of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea* R.) and the distribution of its residues in fish tissues. *J Ocean Univ China*, 2014, 13: 820–824
- 5 Casewell M, Friis C, Marco E, et al. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *J Antimicrob Chemoth*, 2003, 52: 159–161
- 6 Oliveri Conti G, Copat C, Wang Z, et al. Determination of illegal antimicrobials in aquaculture feed and fish: an ELISA study. *Food Control*, 2015, 50: 937–941
- 7 Zhang Q, Cheng J, Xin Q. Effects of tetracycline on developmental toxicity and molecular responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Eco-toxicology*, 2015a, 24: 707–719
- 8 Bellmann C, Tipping A, Sumaila U R. Global trade in fish and fishery products: an overview. *Mar Policy*, 2016, 69: 181–188
- 9 Lillierap A, Macken A, Thomas K V. Recommendations for the inclusion of targeted testing to improve the regulatory environmental risk assessment of veterinary medicines used in aquaculture. *Environ Int*, 2015, 85: 1–4

- 10 Fečkaninová A, Koščová J, Mudroňová D, et al. The use of probiotic bacteria against *Aeromonas* infections in salmonid aquaculture. *Aquaculture*, 2017, 469: 1–8
- 11 Hai N V. Research findings from the use of probiotics in tilapia aquaculture: a review. *Fish Shellfish Immunol*, 2015, 45: 592–597
- 12 Ubeda C, Pamer E G. Antibiotics, microbiota, and immune defense. *Trends Immunol*, 2012, 33: 459–466
- 13 Pamer E G. Resurrecting the intestinal microbiota to combat antibiotic-resistant pathogens. *Science*, 2016, 352: 535–538
- 14 Looft T, Johnson T A, Allen H K, et al. In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 1691–1696
- 15 Cho I, Yamanishi S, Cox L, et al. Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity. *Nature*, 2012, 488: 621–626
- 16 Cox L M, Yamanishi S, Sohn J, et al. Altering the intestinal microbiota during a critical developmental window has lasting metabolic consequences. *Cell*, 2014, 158: 705–721
- 17 Brüssow H. Growth promotion and gut microbiota: insights from antibiotic use. *Environ Microbiol*, 2015, 17: 2216–2227
- 18 Defoirdt T, Boon N, Sorgeloos P, et al. Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. *Trends Biotech*, 2007, 25: 472–479
- 19 Halling-Sørensen B. Inhibition of aerobic growth and nitrification of bacteria in sewage sludge by antibacterial agents. *Arch Environ Contam Toxicol*, 2001, 40: 451–460
- 20 Hermann A C, Millard P J, Blake S L, et al. Development of a respiratory burst assay using zebrafish kidneys and embryos. *J Immunol Methods*, 2004, 292: 119–129
- 21 Zhu S M, Deng Y L, Ruan Y J, et al. Biological denitrification using poly(butylene succinate) as carbon source and biofilm carrier for recirculating aquaculture system effluent treatment. *Bioresour Tech*, 2015, 192: 603–610
- 22 Zhang Q Q, Ying G G, Pan C G, et al. Comprehensive evaluation of antibiotics emission and fate in the river basins of China: source analysis, multimedia modeling, and linkage to bacterial resistance. *Environ Sci Technol*, 2015b, 49: 6772–6782
- 23 Liu Z, Liu W, Ran C, et al. Abrupt suspension of probiotics administration may increase host pathogen susceptibility by inducing gut dysbiosis. *Sci Rep*, 2016, 6: 1–12
- 24 Oyarbide U, Iturria I, Rainieri S, et al. Use of gnotobiotic zebrafish to study *Vibrio anguillarum* pathogenicity. *Zebrafish*, 2015, 12: 71–80
- 25 Faber F, Tran L, Byndloss M X, et al. Host-mediated sugar oxidation promotes post-antibiotic pathogen expansion. *Nature*, 2016, 534: 697–699
- 26 Rivera-Chávez F, Zhang L F, Faber F, et al. Depletion of butyrate-producing *Clostridia* from the gut microbiota drives an aerobic luminal expansion of *Salmonella*. *Cell Host Microbe*, 2016, 19: 443–454
- 27 Gao P, Mao D, Luo Y, et al. Occurrence of sulfonamide and tetracycline-resistant bacteria and resistance genes in aquaculture environment. *Water Res*, 2012, 46: 2355–2364
- 28 Lange K, Buerger M, Stallmach A, et al. Effects of antibiotics on gut microbiota. *Dig Dis*, 2016, 34: 260–268
- 29 Jeong S H, Song Y K, Cho J H. Risk assessment of ciprofloxacin, flavomycin, olaquinox and colistin sulfate based on microbiological impact on human gut biota. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2009, 53: 209–216
- 30 Soler L, Miller I, Hummel K, et al. Growth promotion in pigs by oxytetracycline coincides with down regulation of serum inflammatory parameters and of hibernation-associated protein HP-27. *Electrophoresis*, 2016, 37: 1277–1286
- 31 Araujo F G, Slifer T L, Remington J S. Effect of moxifloxacin on secretion of cytokines by human monocytes stimulated with lipopolysaccharide. *Clin Microbiol Infect*, 2002, 8: 26–30
- 32 Xu D, Gao J, Gilliland Iii M, et al. Rifaximin alters intestinal bacteria and prevents stress-induced gut inflammation and visceral hyperalgesia in rats. *Gastroenterology*, 2014, 146: 484–496.e4
- 33 Hornef M. Pathogens, commensal symbionts, and pathobionts: discovery and functional effects on the host. *ILAR J*, 2015, 56: 159–162
- 34 Coyne, M J, Roelofs K G, Comstock L E. Type VI secretion systems of human gut *Bacteroidales* segregate into three genetic architectures, two of which are contained on mobile genetic elements. *BMC Genomics*, 2016, 17: 1–21
- 35 Round J L, Mazmanian S K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9: 313–323
- 36 Thaiss C A, Zmora N, Levy M, et al. The microbiome and innate immunity. *Nature*, 2016, 535: 65–74
- 37 Kim M, Qie Y, Park J, et al. Gut microbial metabolites fuel host antibody responses. *Cell Host Microbe*, 2016, 20: 202–214
- 38 Rolig A S, Parthasarathy R, Burns A R, et al. Individual members of the microbiota disproportionately modulate host innate immune responses. *Cell Host Microbe*, 2015, 18: 613–620