

隗黎丽, 何 丽, 阮记明, 等. 草鱼幼鱼肝胰脏抗氧化系统对MC-LR胁迫的响应[J]. 农业环境科学学报, 2019, 38(1): 44-50.

WEI Li-li, HE Li, RUAN Ji-ming, et al. Oxidative stress response to MC-LR in the hepatopancreas of juvenile grass carp[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2019, 38(1): 44-50.

草鱼幼鱼肝胰脏抗氧化系统对MC-LR胁迫的响应

隗黎丽¹, 何 丽¹, 阮记明¹, 刘 毅², 付建平², 钟其旺^{3*}

(1. 江西农业大学动物科学技术学院, 南昌 330045; 2. 江西师范大学生命学院, 南昌 330022; 3. 江西农业大学生物科学与工程学院, 南昌 330045)

摘要: 为了研究微囊藻毒素(MC-LR)对草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)幼鱼肝胰脏抗氧化防御系统的影响, 本研究通过腹腔注射的方法(剂量为25、100 $\mu\text{g MC-LR} \cdot \text{kg}^{-1}$, 分别称为低剂量和高剂量), 对草鱼幼鱼进行染毒, 于胁迫24、48 h和72 h后分离其肝胰脏, 随后采用分光光度法检测了草鱼幼鱼肝胰脏中超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性; 同时采用荧光定量PCR方法分析了SOD、CAT、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)和谷胱甘肽还原酶(GR)基因相对表达量的变化。结果显示: 高剂量MC-LR诱导24 h和48 h后, 草鱼幼鱼肝胰脏SOD活性显著增加($P < 0.05$), 而SOD在低剂量组中活性没有显著变化($P > 0.05$); 低剂量MC-LR对CAT活性没有显著影响($P > 0.05$), 而高剂量MC-LR诱导24 h后可使草鱼幼鱼肝胰脏CAT活性显著增加($P < 0.05$), 随后其活性又下降, 但差异不显著($P > 0.05$)。在MC-LR胁迫过程中, SOD、CAT、GPx基因表达在两个剂量组中均显著低于对照组($P < 0.05$), 而GR基因在低剂量MC-LR胁迫24 h后相对表达量显著上调($P < 0.05$), 尽管在72 h相对表达量上调, 但差异不显著($P > 0.05$), 而高剂量组中GR基因在胁迫24 h和48 h后, 其表达量被抑制, 但不存在显著差异($P > 0.05$)。进行抗氧化酶活性和基因表达相关性分析发现, SOD和CAT酶活性与SOD和CAT基因表达不相关。上述研究表明MC-LR对草鱼幼鱼肝胰脏抗氧化系统产生了明显的胁迫效应, 但MC-LR对机体抗氧化酶活性与基因编码调控之间的相互作用机制还有待更深入的研究。

关键词: 微囊藻毒素-LR; 草鱼; 肝胰脏; 抗氧化

中图分类号: S917 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2019)01-0044-07 doi:10.11654/jaes.2018-0159

Oxidative stress response to MC-LR in the hepatopancreas of juvenile grass carp

WEI Li-li¹, HE Li¹, RUAN Ji-ming¹, LIU Yi², FU Jian-ping², ZHONG Qi-wang^{3*}

(1. College of Animal Science and Technology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; 2. College of Life Sciences, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China; 3. College of Bioscience and Bioengineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: To better understand the influence of microcystin-LR (MC-LR) on the oxidative stress response in the hepatopancreas of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), the present study was conducted injecting MC-LR intraperitoneally at doses of 25 $\mu\text{g MC-LR} \cdot \text{kg}^{-1}$ (low-dose group) and 100 $\mu\text{g MC-LR} \cdot \text{kg}^{-1}$ (high-dose group). Samples of hepatopancreases from juvenile grass carp were collected at 24, 48, and 72 h after the initial injection. The activities and transcriptional levels of antioxidant enzymes, including superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), and glutathione reductase (GR), were analyzed using spectrophotometry and quantitative real-time PCR, respectively. The enzymatic activity of SOD in the low-dose group was not significantly changed, but its content in the high-dose group was significantly enhanced at 24 and 48 h ($P < 0.05$), while its content began to decrease at 72 h. The enzymatic activity of CAT just in the high-dose groups was significantly enhanced at 24 h ($P < 0.05$), but the activities in the low- and high-dose groups all decreased at 48 h and 72 h with insignificant differences ($P > 0.05$). The expressions of the SOD, CAT, and GPx genes were all significantly down-regulated during the whole experiment ($P < 0.05$), but the expressions of the GR gene in the low-dose group were significantly up-

收稿日期: 2018-01-29 录用日期: 2018-04-09

作者简介: 隗黎丽(1976—), 女, 湖北天门人, 副教授, 主要从事鱼类免疫学研究。E-mail: hbliliwei@163.com

*通信作者: 钟其旺 E-mail: fishimmuno@163.com, zhongqw2000@163.com

基金项目: 国家自然科学基金项目(31460146, 31760764, 31260643, 31502196)

Project supported: The National Natural Science Foundation of China(31460146, 31760764, 31260643, 31502196)

regulated just at 24 h ($P < 0.05$); another, its expression in two treated group were also up-regulated at 72 h, but the differences were not significant ($P > 0.05$). However, the expressions of GR gene in the high dose group were all down-regulated with insignificant differences at 24 h and 48 h. In addition, correlation analysis of the enzymatic activities and gene expressions showed that the enzymatic activities of SOD and CAT were not correlated with their gene expressions. This study demonstrated that MC-LR could induce oxidative stress in juvenile grass carp by adjusting enzymatic activity and gene expression, but the mechanism of interaction between these needs to be further studied.

Keywords: MC-LR; grass carp; hepatopancreas; antioxidation

在自然环境因子和人类活动的双重影响下,水体的富营养化问题日趋严重,现已经成为全球水生生态系统中所面临的主要环境问题之一^[1]。富营养化水体可导致蓝藻水华的暴发,一些有毒蓝藻细胞破裂后可向水体释放藻毒素。在已发现的藻毒素中,由铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)等产生的微囊藻毒素(Microcystins, MCs)是出现频率最高、产生量最大、危害最严重的一类藻毒素^[2],其中,微囊藻毒素-LR(MC-LR)是目前已知的毒性最强、研究最多的一种MCs。已有的研究表明MC-LR的致毒机理与抑制丝氨酸/苏氨酸磷酸酶1(PP1)和2A(PP2A)有关^[3-5]。除此之外,自从上世纪90年代有学者报道MCs可诱导细胞产生氧化损伤以来^[6],大量的研究报道表明氧化应激也是MCs的致毒机制之一^[7-10],但是MCs如何诱导机体产生氧化应激仍然没有完全弄清楚^[11]。

生物体内的抗氧化防御系统是抵御污染胁迫的第一道屏障,抗氧化因子中的活性成分如超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD),过氧化氢酶(Catalase, CAT),谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GPx)和谷胱甘肽还原酶(Glutathione reductase, GR)等可随污染物胁迫而做出迅速响应^[12]。生物体内的这些抗氧化因子在清除氧自由基和过氧化氢、遏制或减少羟自由基形成、保护机体免受自由基损害等方面具有关键作用。目前,国内外针对MC-LR对鱼类抗氧化酶活性和抗氧化酶基因表达的影响等方面开展了较多的研究,例如,杨静东等^[13]监测了不同时间鲢鱼抗氧化酶活性的变化,发现SOD、CAT、GST和GR活性与组织中MCs的含量呈正相关;任平等^[14]比较了不同浓度MC-LR对斑马鱼(*Danio rerio*)卵巢抗氧化酶的影响,发现卵巢中丙二醛(MDA)含量和谷胱甘肽还原酶(GR)活性在不同浓度处理组中均发生显著下降,谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)活性和GR酶活性随着水体毒素浓度的增加而显著下降;Hou等^[9]研究发现斑马鱼中SOD、CAT、GST、GPx和GSH酶活性以及基因表达变化与MC-LR剂量相关。草鱼(*Ctenopharygodon idella*)作为淡水养殖的主要养殖品

种,尤其是在池塘集约化养殖的情况下,池塘水体极易被MCs污染,如淮河流域池塘水体MCs浓度达到了 $3.69 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[15],超过了世界卫生组织(WHO)规定饮用水中MC-LR含量的安全指导值($1.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)^[16]。但现在还未见有关草鱼幼鱼抗氧化系统对MC-LR胁迫响应的报道,因此,本文将以淡水养殖常见品种——草鱼作为研究对象,从抗氧化酶活性和基因表达变化来评价MC-LR对草鱼幼鱼肝胰脏氧化胁迫的响应。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

实验用草鱼为当年孵化繁殖的幼鱼,平均体重为 $22.13 \pm 2.17 \text{ g}$,购自江西省南昌神龙渔业公司养殖基地。实验用MC-LR(纯度 $\geq 95\%$),购自Taiwan Algal Science Inc公司,间氨基苯甲酸乙酯甲烷磺酸盐(MS-222)为Sigma公司产品, RNA提取试剂盒TRIzol reagent购自Invitrogen公司,逆转录试剂盒RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit和SYBR Green Real-time PCR Master Mix购自Promega公司,酶活性测定试剂盒购于南京建成生物有限公司。

1.2 实验鱼的处理及取样

从养殖场购买的实验草鱼幼鱼在实验室暂养2周,暂养期间每日按照鱼体质量的2.0%投喂商品饲料,试验前48 h停止投喂并将草鱼随机分为实验组和对照组,每组设置3个重复。在先前的研究基础上,实验组草鱼注射剂量设为 $25 \mu\text{g MC-LR}\cdot\text{kg}^{-1}$ (低剂量)和 $100 \mu\text{g MC-LR}\cdot\text{kg}^{-1}$ (高剂量)。对草鱼进行染毒前,根据说明书用甲醇将MC-LR粉末溶解成 $1 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 的储备液,注射前用0.8%生理盐水稀释成所需浓度,每尾鱼注射0.1 mL MC-LR溶液,对照组每尾草鱼则注射等量的0.8%的生理盐水,具体操作方法详见参考文献[17]。各实验组和对照组草鱼分别在处理24、48 h和72 h后各取6尾鱼,使用MS-222麻醉后,用纱布擦干鱼体表面,先迅速分离50 mg左右肝胰脏,置于无RNA酶活性的离心管作为提取RNA的样品,随后分离剩余的肝胰脏放入冰冷的PBS($0.01 \text{ mol}\cdot$

L⁻¹, pH 7.2)中漂洗两次除去血液,滤纸擦干后称重,放入离心管中,用眼科剪刀快速剪碎组织,整个操作在冰水浴中进行。随后将样品置于液氮中保存备用。

1.3 酶活性的测定分析

将液氮中保存的作为酶活性分析的肝胰脏样品按质量(g):体积(mL)=1:9的比例加入9倍体积的生理盐水,冰水浴条件下匀浆,2500 r·min⁻¹,离心10 min,收集上清液测定酶活性。SOD和CAT活性的测定的具体操作步骤均根据南京建成生物工程研究所提供的试剂盒说明书进行,SOD活性采用黄嘌呤氧化酶法测定,在波长为550 nm处比色测定吸光度值计算其活力,活力单位定义为每毫克组织蛋白在反应液中SOD抑制率达到50%时所对应的SOD量为1个SOD活力单位(U·mg⁻¹ prot)。CAT活性通过405 nm波长下测定H₂O₂减少的量测定,活力单位定义为每毫克组织蛋白每秒钟分解1 μmol的H₂O₂的量作为1个CAT活力单位(U·mg⁻¹ prot)。蛋白含量采用考马斯亮蓝法,以南京建成生物工程研究所提供的试剂盒中蛋白标准液为标准蛋白,同样按照试剂盒说明书进行测定。

1.4 核酸的提取、cDNA模板的合成及qRT-PCR检测分析

采用Invitrogen公司的Trizol试剂盒提取总RNA,具体提取方法参考试剂盒的说明书进行。cDNA按RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit操作手册进行合成。Real-time quantitative PCR(qRT-PCR)反应在伯乐公司CFX96 Touch™ Real-time PCR Detection System上完成。反应所有引物见表1,其中引物参考了文献[18]。反应体系根据Promega公司的SYBR Green Real-time PCR Master Mix的说明配制,共20 μL,反应条件:94 °C变性5 min,94 °C 10 s,58 °C 15 s,72 °C 20 s,45个循环,72 °C延伸5 min。荧光定量PCR的数据采用2^{-ΔΔCT}法进行计算。

1.5 数据分析

实验数据均以平均值±标准差表示,采用多因素方差分析进行统计学检验(SPSS 16.0),统计学显著性水平设定P<0.05表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 MC-LR对草鱼幼鱼肝胰脏抗氧化酶活性的影响

多因素方差分析结果表明,不同MC-LR诱导时间(24、48 h和72 h)对SOD酶活性有显著影响($F=8.161, P=0.001$),不同的诱导剂量对其活性也有显著影响($F=5.053, P=0.010$),作用时间和诱导剂量之间有交互作用($F=3.397, P=0.016$)。由图1A可知,低剂量组草鱼幼鱼肝胰脏SOD活性在3个时间段变化均不明显,无统计学意义($P>0.05$)。高剂量组草鱼幼鱼肝胰脏SOD活性在24 h和48 h均显著上升($P<0.05$),且在24 h后达到高峰,为778.97 U·mg⁻¹ prot,随后下降,在72 h的活性下降为252.29 U·mg⁻¹ prot,差异不显著($P>0.05$)。

对CAT活性进行多因素方差分析表明,MC-LR诱导不同时间后对CAT酶活性有显著影响($F=19.642, P<0.001$),不同的诱导剂量对其活性影响无显著差异($F=0.925, P=0.404$),作用时间和诱导剂量之间有交互作用($F=5.607, P=0.001$)。由图1B可知,在24 h,高剂量组肝胰脏中CAT活性在24 h升高,达到43.99 U·mg⁻¹ prot,与对照组相比差异显著($P<0.05$),随后活性下降;而低剂量组肝胰脏中CAT活性在24 h增强,但与对照组相比差异不显著($P>0.05$)。然而,低剂量组和高剂量组肝胰脏CAT活性在48 h和72 h均下降,但与对照组相比差异均不显著($P>0.05$)。

2.2 MC-LR对草鱼幼鱼肝胰脏抗氧化基因的影响

采用qRT-PCR检测了MC-LR胁迫下草鱼幼鱼

表1 荧光定量PCR扩增的引物

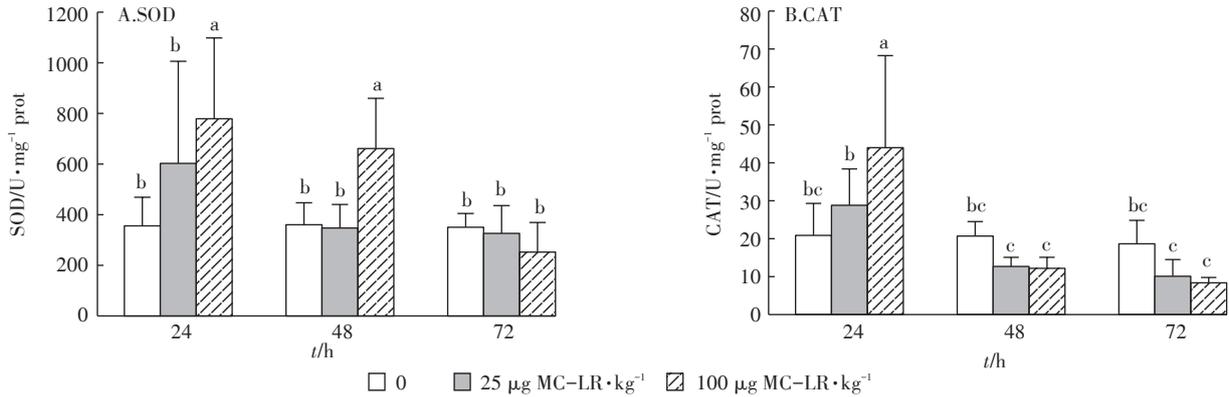
Table 1 The primers of genes used for quantitative real-time PCR analysis

基因名称 Gene name	登录号 GenBank NO.	引物序列(5'-3') Primers (5'-3')	扩增片段 Amplicon size/bp
SOD	GU901214	Forward:CGCACTTCAACCCCTTACA Reverse:ACTTTCCTCATTGCCTCC	218
GPx	EU828796	Forward:GGGCTGGTTATTCTGGGC Reverse:AGGCGATGTCATTCTGTTC	278
CAT	FJ560431	Forward:GAAGTTCTACACCGATGAGG Reverse:CCAGAAATCCCAAACCAT	158
GR	JX854448	Forward:CATCGTCATCAGACAAGGCG Reverse:CCCAGAGCAGACAGTCCACC	222
β-actin	M25013.1	Forward:GGCTGTGCTGTCCCTGTA Reverse:GGGCATAACCCCTCGTAGAT	101

肝胰脏SOD、CAT、GPx和GR基因表达量的变化(图2)。多因素方差分析统计结果表明,MC-LR诱导不同时间(24、48 h和72 h)对SOD基因有显著影响($F=6.341, P=0.004$),不同的诱导剂量对其表达也有显著影响($F=1.086E3, P=0.000$),但作用时间和诱导剂量之间无交互作用($F=1.314, P=0.279$)。LSD分析结果表明,经不同剂量MC-LR胁迫不同时间后,SOD基因的表达量与对照组相比均显著下降($P<0.05$),且低剂

量组和高剂量组中肝胰脏SOD随着时间的延长,表达量呈现逐渐下降的趋势(图2A)。

用多因素方差分析草鱼幼鱼经不同剂量MC-LR胁迫不同时间后肝脏中CAT基因表达的变化,结果表明,MC-LR不同诱导时间(24、48 h和72 h)对CAT基因表达无显著影响($F=1.095, P=0.343$),而不同的诱导剂量对其表达有显著影响($F=52.069, P=0.000$),作用时间和诱导剂量之间无交互作用($F=1.132, P=$



不同字母表示组间存在显著性差异($P<0.05$)。下同

Marked with different letters in figure indicate significant differences among groups ($P<0.05$). The same below

图1 MC-LR对草鱼幼鱼肝胰脏SOD和CAT活性的影响

Figure 1 The effects of MC-LR on the enzymatic activities of SOD and CAT in the hepatopancreas of grass carp

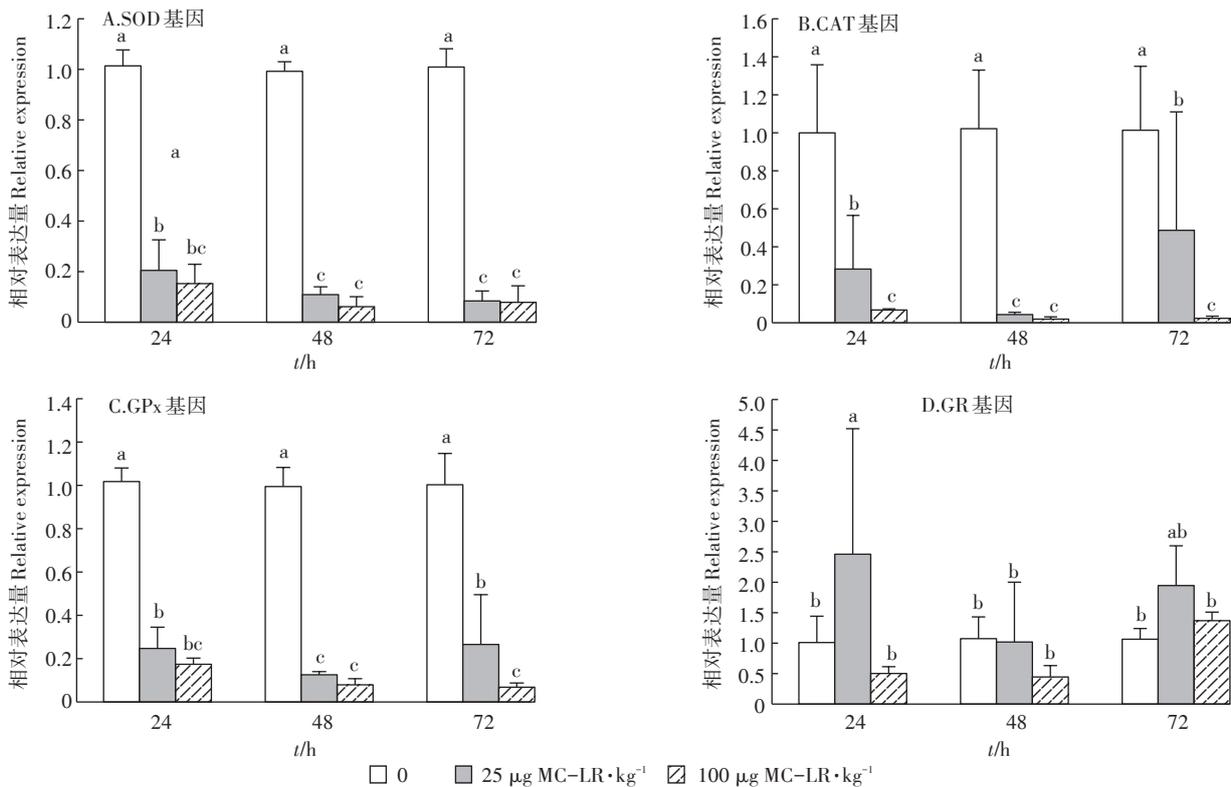


图2 MC-LR对草鱼幼鱼肝胰脏中抗氧化基因表达水平的影响

Figure 2 The effects of MC-LR on the expression of antioxidative genes in hepatopancreas of grass carp

0.354)。LSD分析结果表明,CAT基因的表达量在MC-LR胁迫的第24、48 h和72 h,两个剂量组草鱼幼鱼肝胰脏CAT的表达量均显著低于对照组($P<0.05$)。低剂量组CAT表达量呈现先下降后升高趋势,高剂量组CAT表达量呈现逐渐下降趋势,在72 h后,高剂量组草鱼幼鱼肝胰脏中CAT基因的相对表达量仅为0.02(图2B)。

多因素方差分析统计草鱼幼鱼肝胰脏中GPx基因表达变化的结果表明,MC-LR诱导不同时间(24、48 h和72 h)对GPx基因表达无显著影响($F=2.676$, $P=0.080$),不同的诱导剂量对其活性有显著影响($F=401.271$, $P<0.001$),作用时间和诱导剂量之间无交互作用($F=1.248$, $P=0.304$)。LSD分析结果表明,GPx基因表达量的变化如图2C所示,在两个剂量组中,GPx在MC-LR胁迫不同时间后,表达量均显著下降($P<0.05$)。低剂量组中草鱼幼鱼肝胰脏GPx的表达变化呈现先降低后升高趋势,表达量在胁迫48 h时,抑制程度最低,相对表达量为0.13;高剂量组中GPx的表达变化呈现逐渐降低的趋势,在72 h时,其相对表达量为0.07(图2C)。

草鱼幼鱼肝胰脏中GR基因表达量变化的统计分析结果表明,MC-LR诱导不同时间(24、48 h和72 h)对GR基因表达无显著影响($F=2.787$, $P=0.072$),不同的诱导剂量对其表达有显著影响($F=7.707$, $P=0.001$),作用时间和诱导剂量之间无交互作用($F=2.192$, $P=0.085$)。GR基因表达量的变化如图2D所示,GR基因的表达量在低剂量组呈现先升高,后降低再升高的趋势,在24 h,其表达量上调至2.46倍,存在显著差异($P<0.05$),随后下降,但在72 h,其表达量又上调至1.95倍,与对照组相比,差异不显著($P>0.05$);而高剂量组草鱼幼鱼肝胰脏GR基因呈现先下降后上升的趋势,但在72 h,其相对表达量仍被抑制,GR基因在3个时间段的相对表达量差异均显著($P>0.05$)。

2.3 MC-LR对草鱼幼鱼肝脏抗氧化酶活性与基因表达的相关性分析

对抗氧化酶活性与基因表达相关性进行分析,结果表明,不同处理组中,SOD活性与其基因表达的相关系数 $r=-0.261$ ($P=0.056$),在 $\alpha=0.01$ 下线性关系不显著;CAT活性与其基因表达的相关系数 $r=-0.085$ ($P=0.541$),在 $\alpha=0.01$ 下线性关系也不显著(表2)。

3 讨论

3.1 MC-LR对草鱼幼鱼肝胰脏SOD和CAT活性的影响

从抗氧化防御系统的角度来研究微囊藻毒素对鱼类的毒性作用机制是一个备受关注的科学问题。在正常情况下,生物体内SOD和CAT等可以及时清除受环境胁迫时产生的过量活性氧,从而使活性氧的产生和清除保持一种动态平衡^[13]。本实验研究发现,低剂量的MC-LR对草鱼幼鱼肝胰脏SOD活性没有影响,高剂量的MC-LR使草鱼幼鱼肝胰脏SOD活性明显升高;而草鱼幼鱼肝胰脏CAT活性仅在高剂量MC-LR胁迫24 h后,其活性显著升高,其他变化均不显著。本实验中酶活性的这种变化趋势与其他学者的报道有一定相似性,如Pavagadhi等^[8]发现低浓度MC-LR($<5.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)可诱导SOD活性上升,而高浓度($>5.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)使SOD活性降低。Yuan等^[19]研究报道低浓度(0.1、1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)的MC-LR对克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)SOD和CAT活性没有影响,然而高浓度(10、100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)的MC-LR可诱导其SOD和CAT活性在暴露早期升高,而随着暴露时间的延长,则降低了SOD和CAT的活性。SOD和CAT均为细胞内重要的抗氧化酶,SOD能将超氧化物阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)转化成过氧化氢(H_2O_2),然后在CAT的作用下转变成 H_2O ,当毒素量较高时,可能会引起SOD和CAT活性的消耗过快,从而导致其活性下降^[20]。除了浓度的影响之外,朱枫等^[21]认为暴露时间的差异也可引起SOD活性的变化,短时间诱导后,SOD为清除过多的ROS

表2 MC-LR胁迫后抗氧化酶活性和基因表达的相关性分析

Table 2 Correlation analysis of oxidative enzymatic activities and gene expression under MC-LR stress

指标	SOD酶活性	CAT酶活性	SOD基因表达	CAT基因表达	GPx基因表达	GR基因表达
SOD酶活性		0.607*	-0.261	0.027*	0.067	0.218
CAT酶活性	0.607		0.061	-0.085	0.054	0.030
SOD基因表达	-0.261	0.061		0.801*	0.967*	-0.085
CAT基因表达	-0.027*	-0.085	-0.261		0.834*	-0.023
GPx基因表达	-0.251	0.054	0.967*	0.834*		-0.072
GR基因表达	0.218	0.030	-0.085	-0.023	-0.072	

而活性快速上升,随着时间的延长,SOD快速消耗又使其活性下降;CAT的活性同样随着诱导时间的延长,其活性下降。另外,也有学者认为在暴露的早期阶段,MC-LR可促使机体抗氧化初级防御系统迅速做出反应出现应激性的保护,随着MC-LR的持续作用,抗氧化酶消耗直到耗竭,从而细胞抗氧化防御系统功能减弱或丧失^[22]。根据以上分析可知,本实验中SOD和CAT酶活性的这种变化是机体抵御氧化损伤的一种保护机制。

3.2 MC-LR对草鱼幼鱼肝胰脏抗氧化基因表达的影响

生物体在基因水平的响应是生物应对环境变化的早期响应之一,抗氧化基因表达的改变可能在抵御MCs诱导的氧化毒性中起着重要的作用^[23]。本研究发现抗氧化基因SOD、CAT和GPx在低剂量组和高剂量组中胁迫不同时间后,相对表达量均显著下降,这与其他学者的报道比较相似,如Jayaraj等^[7]研究发现小鼠(*Mus musculus*)暴露在高剂量MC-LR($76.62 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)中GPx基因表达被抑制,但更多研究表明,不同剂量MCs诱导的氧化应激可使抗氧化基因表达趋势不一致,如Hou等^[9]报道低剂量的MC-LR($50 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)在暴露早期可诱导基因表达增加,然而高剂量MC-LR($200 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)可使斑马鱼肝脏中SOD和GPx基因表达下降。在鲫鱼(*Carassius auratus*)暴露实验中,发现MC-LR可使GPx和GR基因表达下调,CAT和SOD基因表达明显上升^[24]。另外,本文对GR基因的表达研究发现,GR表达量的变化则与诱导时间和剂量有关,低剂量在暴露早期(24 h),其相对表达量显著上调,而高剂量诱导早期(24 h和48 h),其表达量则下降,但差异不显著,这与其他学者的报道不太一致,如小鼠暴露在MC-LR($38.31 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)中,GR基因表现为显著下调,而暴露在较高浓度($76.62 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)MC-LR中却明显上调^[7]。根据以上研究报道可推测抗氧化酶相关基因的表达变化与MC-LR的浓度和时间均有一定关系,此外,基因表达下降或许与MCs直接损伤抗氧化相关基因的蛋白结构有关^[25]。

3.3 MC-LR对草鱼幼鱼肝胰脏抗氧化酶活性和基因表达的相关性影响

一般来说,在相同的环境毒物刺激下,SOD和CAT酶活性的变化是一致的^[26],但本研究发现草鱼幼鱼经MC-LR诱导后,草鱼幼鱼肝胰脏中SOD和CAT酶活性变化没有相关性,如本实验中高剂量组肝脏中SOD在染毒48 h相对于对照组显著上升,而CAT在染毒48 h却显著下降了,两个酶活性的变化趋势不

一致,这与Shi等的报道比较相似^[27]。另外,有研究报道抗氧化酶相关基因的表达与酶活性变化的相关性不大^[7],本研究也发现类似现象,分析发现草鱼幼鱼经MC-LR诱导后,肝胰脏中SOD和CAT酶活性与其基因表达的变化没有相关性,然而,Xiong等^[23]和Galanti等^[28]均表明MCs诱导的氧化应激可使抗氧化酶活性和基因表达增加,并且抗氧化酶活性和基因表达之间呈现正相关。有学者研究发现抗氧化酶相关基因表达水平的改变会直接导致细胞抗氧化防御体系中抗氧化酶活性的变化,从而影响到抗氧化防御体系的效果,进一步放大了MCs引起的机体抗氧化还原系统的失衡^[21]。不同的试验所用的MC-LR剂量以及胁迫时间的不同,从而导致抗氧化酶活性和基因表达的变化曲线呈现多样性。本研究发现SOD和CAT活性在早期阶段都是上升的,随着胁迫时间的延长,又呈现下降的趋势,而SOD、CAT和GPx基因表达在早期就被抑制了,其原因可能是MC-LR胁迫导致ROS过量产生^[29],破坏了细胞内蛋白质结构与功能,导致基因表达持续下降,也有可能是转录反应比酶活性更敏感,另外,基因表达量与酶活性表现并不完全一致也可能与转录后调控事件有关。综上所述,MC-LR胁迫下草鱼幼鱼肝胰脏抗氧化防御酶活性及其基因表达会发生改变,但MC-LR对机体抗氧化系统的影响是一个复杂的过程,尤其是MC-LR对机体抗氧化酶活性与基因编码调控之间的相互作用机制还有待更深入的研究。

4 结论

(1)在MC-LR胁迫草鱼幼鱼早期阶段可诱导其肝胰脏抗氧化酶SOD和CAT活性升高,随后活性下降,但两者之间没有相关性。

(2)MC-LR胁迫下,低剂量组和高剂量组草鱼幼鱼肝胰脏中SOD、CAT和GPx基因表达均被抑制,说明抗氧化基因对外界环境较敏感,即使低剂量的MC-LR也影响机体的转录水平。在今后进行生物标记物筛选时,尤其是在MC-LR胁迫早期阶段,可从基因水平预警MC-LR的生态风险。

参考文献:

- [1] Smith V H, Schindler D W. Eutrophication science: Where do we go from here[J]. *Trends in Ecology and Evolution*, 2009, 24(4): 201-207.
- [2] Dawson R M. The toxicology of microcystins[J]. *Toxicol*, 1998, 36(7): 953-962.
- [3] Pereira S R, Vasconcelos V M, Antunes A. Computational study of the

- covalent bonding of microcystins to cysteine residues—a reaction involved in the inhibition of the PPP family of protein phosphatases[J]. *FEBS Journal*, 2013, 280(2):674–680.
- [4] MacKintosh C, Beattie K A, Klumpp S, et al. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants[J]. *FEBS Letters*, 1990, 264(2):187–192.
- [5] Runnegar M, Berndt N, Kong S M, et al. In vivo and in vitro binding of microcystin to protein phosphatases 1 and 2A[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1995, 216(1):162–169.
- [6] Guzman R E, Solter P F. Hepatic oxidative stress following prolonged sublethal microcystin LR exposure[J]. *Toxicologic Pathology*, 1999, 27(5):582–588.
- [7] Jayaraj R, Anand T, Rao P V. Activity and gene expression profile of certain antioxidant enzymes to microcystin-LR induced oxidative stress in mice[J]. *Toxicology*, 2006, 220(2/3):136–146.
- [8] Pavagadhi S, Gong Z, Hande M P, et al. Biochemical response of diverse organs in adult *Danio rerio* (zebrafish) exposed to sublethal concentrations of microcystin-LR and microcystin-RR: A balneation study [J]. *Aquatic Toxicology*, 2012, 109:1–10.
- [9] Hou J, Li L, Xue T, et al. Hepatic positive and negative antioxidant responses in zebrafish after intraperitoneal administration of toxic microcystin-LR[J]. *Chemosphere*, 2015, 120:729–736.
- [10] Leão J C, Geracitano L A, Monserrat J M, et al. Microcystin-induced oxidative stress in *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae)[J]. *Marine Environmental Research*, 2008, 66(1):92–94.
- [11] Amado L L, Monserrat J M. Oxidative stress generation by microcystins in aquatic animals: Why and how[J]. *Environment International*, 2010, 6:226–235.
- [12] Stara A, Kristan J, Zuskova E, et al. Effect of chronic exposure to prometryne on oxidative stress and antioxidant response in common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *Pesticide Biochemistry Physiology*, 2013, 105(1):18–23.
- [13] 杨静东, 胡梁斌, 周威, 等. 微囊藻毒素在鲈鱼体内生物富集及其体内的抗氧化反应[J]. *生态环境学报*, 2009, 6:2044–2050.
YANG Jing-dong, HU Liang-bin, ZHOU Wei, et al. Bioaccumulation of microcystin and antioxidative response in *Carassius auratus* L. [J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2009, 18(6):2044–2050.
- [14] 任平, 王玉军. 微囊藻毒素慢性毒性染毒对斑马鱼卵巢组织抗氧化酶的影响[J]. *洛阳理工学院学报(自然科学版)*, 2010, 20(2):12–14, 36.
REN Ping, WANG Yu-jun. Effects of sub-chronic exposure to microcystic toxins on antioxidant of zebrafish ovary organization[J]. *Journal of Luoyang Institute of Science and Technology (Natural Science Edition)*, 2010, 20(2):12–14, 36.
- [15] 虞聪聪. 淮河流域X县水体藻类及其毒素污染状况及微囊藻毒素LR与黄曲霉毒素B1的联合毒性作用研究[D]. 上海:复旦大学, 2014.
YU Cong-cong. Pollutions by algae and microcystins in water bodies of X county in Huai river basin and the toxicity induced by the combination effects of microcystin-LR and aflatoxin-B1[D]. Shanghai: Fudan University, 2014.
- [16] Gehringer M. Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: A dualistic response[J]. *FEBS Letters*, 2004, 557:1–8.
- [17] 魏黎丽, 刘毅, 王自蕊, 等. MC-LR急性胁迫对草鱼脾脏、头肾显微结构及BAFF和APRIL基因表达的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2017, 36(1):2379–2387.
WEI Li-li, LIU Yi, WANG Zi-rui, et al. Acute effects of microcystin-LR on the microstructure of spleen and head kidney and the expression of BAFF and APRIL genes in grass carp[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2017, 36(1):2379–2387.
- [18] Zhao H, Jiang W, Liu Y, et al. Dietary choline regulates antibacterial activity, inflammatory response and barrier function in the gills of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2016, 52:139–150.
- [19] Yuan J, Gu Z, Zheng Y, et al. Accumulation and detoxification dynamics of microcystin-LR and antioxidant responses in male red swamp crayfish *Procambarus clarkii*[J]. *Aquatic Toxicology*, 2016, 177:8–18.
- [20] 陈华, 陈昱, 王志红, 等. 颤藻粗提物对小鼠肝毒性及SOD活性影响研究[J]. *中国公共卫生*, 2002, 18(2):133–134.
CHEN Hua, CHEN Yu, WANG Zhi-hong, et al. Algae hepatotoxicity and superoxide dismutase(SOD) activity induced by *Oscillatoria*-extract in mouse[J]. *China Public Health*, 2002, 18(2):133–134.
- [21] 朱枫, 钱晨, 卢彦. 微囊藻毒素诱导细胞氧化损伤胁迫的研究进展[J]. *生态毒理学报*, 2010, 5(6):769–775.
ZHU Feng, QIAN Chen, LU Yan. Progress in oxidative stress on cell induced by microcystin[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2010, 5(6):769–775.
- [22] 许川, 舒为群, 曹佳, 等. 绿茶对微囊藻毒素诱导肝肾氧化损伤的拮抗效应[J]. *中华预防医学杂志*, 2007, 41(1):8–12.
XU Chuan, SHU Wei-qun, CAO Jia, et al. Antagonism effects of green tea against microcystin induced oxidant damage on liver and kidney[J]. *China Journal Prevent Medicine*, 2007, 41(1):8–12.
- [23] Xiong Q, Xie P, Li H, et al. Acute effects of microcystins exposure on the transcription of antioxidant enzyme genes in three organs (liver, kidney, and testis) of male Wistar rats[J]. *Journal of Biochemical Molecular Toxicology*, 2010, 24(6):361–367.
- [24] Sun Y, Tang R, Li D, et al. Acute effects of microcystins on the transcription of antioxidant enzyme genes in crucian carp *Carassius auratus*[J]. *Environmental Toxicology*, 2008, 23(2):145–152.
- [25] Sicińska P, Bukowska B, Michałowicz J, et al. Damage of cell membrane and antioxidative system in human erythrocytes incubated with microcystin-LR in vitro[J]. *Toxicol*, 2006, 47(4):387–397.
- [26] Dimitrova M S T, Tsinova V, Velcheva V. Combined effects of zinc and lead on the hepatic superoxide dismutase-catalase system in carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology: Part C*, 1994, 108:43–46.
- [27] Shi Y, Jiang J, Shan Z, et al. Oxidative stress and histopathological alterations in liver of *Cyprinus carpio* L. induced by intraperitoneal injection of microcystin-LR[J]. *Ecotoxicology*, 2015, 24:511–519.
- [28] Galanti L N, Amé M V, Wunderlin D A. Accumulation and detoxification dynamic of cyanotoxins in the freshwater shrimp *Palaemonetes argentinus*[J]. *Harmful Algae*, 2013, 27:88–97.
- [29] Yin L, Huang J, Huang W, et al. Responses of antioxidant system in *Arabidopsis thaliana* suspension cells to the toxicity of microcystin-RR [J]. *Toxicol*, 2005, 46(8):859–864.