

微囊藻毒素 MC-LR 对罗非鱼(*Oreochromis niloticus*) 肝脏谷胱甘肽含量及其相关酶活性的影响

陈家长^{1,2}, 宋超², 胡庚东¹, 瞿建宏¹, 孟顺龙¹, 范立民¹

(1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 中国水产科学研究院内陆渔业生态环境和资源重点开放实验室, 江苏 无锡 214081;

2. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081)

摘要:采用腹腔注射的方式研究了微囊藻毒素 MC-LR(注射剂量为 $500 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ BW}$)胁迫下罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)肝脏谷胱甘肽(GSH)含量及其相关酶 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶(γ -GCS)、谷胱甘肽硫转移酶(GST)、谷胱甘肽还原酶(GR)和谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)活性的动态变化。结果表明,MC-LR 能够对罗非鱼肝脏 GSH 含量及其相关酶活性产生明显影响。在 MC-LR 胁迫下,与对照组相比,GSH 含量呈现先下降后上升趋势,总体上被诱导;罗非鱼肝脏 γ -GCS 和 GST 在试验过程中出现两次显著升高现象,在 GST 作用下,GSH 与 MC-LR 结合会造成 GSH 的消耗, γ -GCS 和 GR 的活性增强能够使 GSH 含量升高,从而使罗非鱼肝脏 GSH 能够维持一定水平;GR 和 GPx 的活性均表现为先上升后下降,它们能有效调节罗非鱼肝脏 GSH-GSSG 缓冲系统,从而在减轻或消除由 MC-LR 侵入而造成的肝细胞氧化胁迫中发挥重要作用。

关键词:腹腔注射;罗非鱼;微囊藻毒素(MC-LR);谷胱甘肽;谷胱甘肽相关酶

中图分类号:X503.225 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2010)09-1670-05

The Effect of MC-LR on Glutathione Concentration and Its Related Enzymes Activity in Liver of Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

CHEN Jia-zhang^{1,2}, SONG Chao², HU Geng-dong¹, QU Jian-hong¹, MENG Shun-long¹, FAN Li-min¹

(1.Key Open Laboratory of Ecological Environment and Resources of Inland Fisheries, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China; 2.Wuxi Fishery College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China)

Abstract: The effects of microcystin-LR (MC-LR) on the dynamic changes of the concentration of glutathione (GSH) and the activity of GSH related enzymes, such as γ -Glutamylcysteine synthetase (γ -GCS), Glutathione S-transferase (GST), Glutathione peroxidase (GPx), Glutathione reductase (GR) in the liver of tilapia were studied by intraperitoneal injection. The results showed that GSH concentration and its related enzymes activities could be significantly influenced by MC-LR. GSH concentration in tilapia liver decreased firstly and then increased and GSH concentration increased as a whole during the test. Both γ -GCS and GST activity had two peak values that were all significant higher than that of the control during the test. The combination of GSH and MC-LR could contributed to GSH consumption and the increase of γ -GCS and GR activity could increase GSH concentration, therefore, the GSH concentration in the liver of tilapia could maintain initial value. The activities of both GR and GPx increased firstly and then decreased. GR and GPx could effectively adjust the GSH-GSSG buffer system, which plays an important role in lightening or eliminating the liver cells oxidation intimidation caused by MC-LR invading.

Keywords: intraperitoneal injection; tilapia; microcystin-LR(MC-LR); glutathione; glutathione related enzymes

蓝藻水华是淡水水体富营养化的一个主要问题,水华产生的微囊藻毒素(MCs)对鱼类非常有害。MCs

在结构上是一种环肽,迄今已有 75 种以上的 MC 被确认^[1],如 MC-LR,MC-YR,MC-RR 等。由于 MC-LR 的毒性作用在所有亚型结构中最大,对 MCs 的毒性研究一般是以 MC-LR 为主^[2]。

罗非鱼是我国的重要水产品,南方地区是罗非鱼的主产区。受气候温暖以及经济发展迅速等因素的影

收稿日期:2010-03-18

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项资金(nycytx-48)

作者简介:陈家长(1964—),男,硕士,研究员,主要从事水产环境方面的研究工作。E-mail:chenjz@ffrc.cn

响,南方是我国蓝藻水华的高度爆发区,造成罗非鱼的养殖很有可能在含有蓝藻毒素的池塘中进行,从而对罗非鱼的质量安全构成潜在威胁。因此,研究 MCs 对罗非鱼的毒性作用显得尤为重要。

近年来,氧化胁迫被认为是 MCs 的一个主要的毒性作用机制^[3]。MCs 会引起鱼体组织活性氧(ROS)的增加,打破机体原有的氧化压力平衡。为了消除过多的 ROS,机体会启动抗氧化防御系统,其中谷胱甘肽(GSH)及其相关酶,如谷胱甘肽还原酶(GR)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)、谷胱甘肽硫转移酶(GST)、 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶(γ -GCS)等在机体的抗氧化防御系统中发挥着重要作用。

当前,对 MCs 引起罗非鱼各组织氧化压力的研究虽有少量报道^[2,4],但他们的研究仅选取一个或两个时间点,不能很好地反映谷胱甘肽及其相关酶活性的动态变化过程。本文通过腹腔注射的方式,探讨了在不同注射时间下罗非鱼肝脏谷胱甘肽及其相关酶活性的动态变化过程,为分析评估 MCs 的水生态安全性提供相应的毒理学资料,同时也为我国淡水渔业资源和水生态系统的保护提供一些科学依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

MC-LR (纯度 $\geq 95\%$, by HPLC) 购自 ZEN-U Biotechnology Co., LTD (台湾); γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶(γ -GCS)酶联免疫检测试剂盒购自美国 R&D 公司;还原型谷胱甘肽(GSH)试剂盒、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)试剂盒、谷胱甘肽还原酶(GR)试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)试剂盒、考马斯亮兰总蛋白试剂盒和标准蛋白均由南京建成生物工程研究所提供;其他试剂为分析纯,为上海化学试剂厂产品。

主要仪器和试验设备有 721 分光光度计、酶标仪(Elx 808, 基因有限公司)、水族箱、充氧机、电子分析天平、组织匀浆器、恒温水浴锅、Sigma2-16K 低温冷冻高速离心机、台式离心机。

1.2 试验鱼类和试验用水

试验用鱼为尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*),由中国水产科学研究院淡水渔业研究中心南泉养殖场提供,平均体长为 (8.5 ± 0.5) cm, 平均体重为 (40 ± 1.5) g。试验前经筛选并在水族箱中驯养 10 d 以上,没有出现异常死亡情况。驯养期间每日定时投自制的颗粒饵料。为防止饵料可能对毒性试验的结果产生干扰,试验前一天开始禁食。试验用水族箱规格为 45

cm $\times$ 45 cm $\times$ 65 cm,水体的有效体积为 80 L。

试验用水为曝气 7 d 后的除氯自来水,pH 值为 6.85~7.05,总硬度为 7.85~8.10 德国度,Zn $0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,Fe $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,Pb、Cu 和 Cd 未检出,COD_{Mn} 含量为 2.25~2.45 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,溶氧量保持在 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上,试验水温为 $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。

1.3 腹腔注射

将受试鱼随机分为两组。根据文献所报道的引起罗非鱼急性毒性效应的 MC-LR 的剂量^[2],试验组注射 $500 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ BW 的藻毒素(注射剂量为 0.2 mL),对照组注射同等剂量的生理盐水。每组设一个平行。试验期间未发现鱼死亡。

1.4 鱼体取样及组织前处理

取样时间分别为 2、12、24、48、162 h。每个时间点取样时对对照组和处理组中各取出 3 条鱼,连同平行中的鱼,每组共有 6 条鱼。取出的鱼麻醉后,用纱布擦干其表面,取出鱼的肝脏(约 0.5~1 g),放入冰冷的生理盐水中漂洗,除去血液,滤纸拭干后称重,放入 5~10 mL 的小烧杯中,先用移液管取总量 2/3 的预冷的 0.9%的生理盐水(生理盐水的体积总量(mL)应是组织质量(mg)的 9 倍)于烧杯中,用眼科剪刀尽快剪碎组织(室温大于 25°C 时操作应在冰水浴中进行)。将剪碎的组织倒入匀浆器中,再把剩余的 1/3 生理盐水冲洗残留在烧杯中的组织,一并倒入匀浆器中。将匀浆器的下部放入冰水浴中,充分转动研磨,使组织匀浆化。将制备好的 10%匀浆于 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 10 min,取上清液进行测定。

1.5 测定方法

采用南京建成生物工程研究所提供的试剂盒测定鱼体肝脏中谷胱甘肽(GSH)含量和谷胱甘肽-S 转移酶(GST)、谷胱甘肽还原酶(GR)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)的活性,并用考马斯亮兰总蛋白试剂盒和标准蛋白测定组织的蛋白质含量,测试方法均为比色法。GSH 的单位为 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{prot}$,GST 的单位为 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$,GR 的单位为 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1} \text{prot}$,GPx 的单位为 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1} \text{prot}$ 。U 的定义为:每毫克蛋白,在 37°C 反应 1 min,扣除非酶促反应,使反应体系中 GSH 浓度降低 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为一个酶活力单位。试验采用美国 R&D 公司提供的 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶(γ -GCS)酶联免疫检测试剂盒试验测定 γ -GCS 的活性,单位为 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.6 数据处理

实验使用 JMP 统计软件(JMP 统计软件为 SAS

公司旗下商用软件,版本 7.0),采用 t-test 对试验数据进行显著性检验, $P<0.05$ 为差异显著, $P<0.01$ 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 MC-LR 对罗非鱼肝脏 GST 活性的影响

从图 1 可以看出,GST 的活性在 2、48 h 时均显著高于同期对照组(分别为 $P<0.05$ 、 $P<0.01$),而在 12、24 h 和 162 h 与对照组没有显著差异($P>0.05$)。

2.2 MC-LR 对罗非鱼肝脏 γ -GCS 活性和 GSH 含量的影响

从图 2 可以看出,在 48 h 之前, γ -GCS 活性有不同程度的升高,在 12 h 和 48 h 时与同期对照组相比显著上升(分别为 $P<0.01$ 、 $P<0.05$);在 2 h 和 24 h 时与同期对照组相比差异不显著($P>0.05$),162 h 时 γ -GCS 活性恢复正常。

从图 3 可以看出,GSH 含量在 2 h 时极显著高于

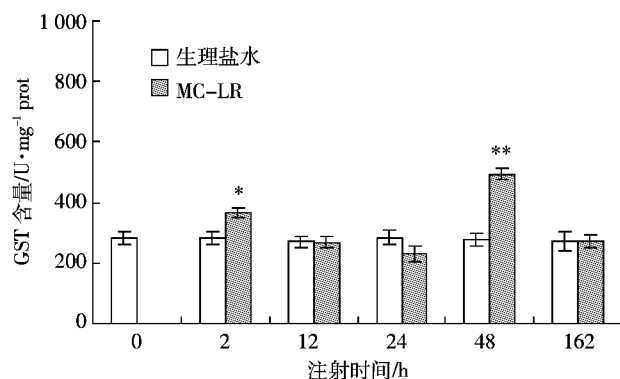


图 1 不同注射时间下罗非鱼肝脏中 GST 活性

Figure 1 Glutathione S-transferase (GST) activities in the liver of tilapia injected by MC-LR at different time

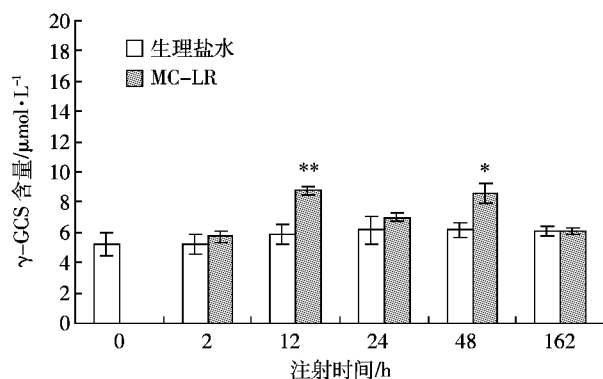


图 2 不同注射时间下罗非鱼肝脏中 γ -GCS 活性

Figure 2 γ -Glutamylcysteine synthetase (γ -GCS) activities in the liver of tilapia injected by MC-LR at different time

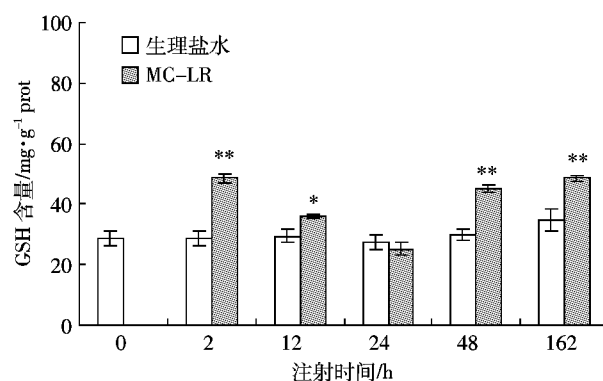


图 3 不同注射时间下罗非鱼肝脏中 GSH 的含量

Figure 3 Glutathione (GSH) concentration in the liver of tilapia injected by MC-LR at different time

对照组($P<0.01$),之后逐渐降低,至 24 h 降至最低,然后又开始回升,并在 48 h 时极显著高于对照组($P<0.01$),且直到试验结束时 GSH 含量仍然保持较高水平($P<0.01$)。

2.3 MC-LR 对罗非鱼肝脏 GPx、GR 活性的影响

从图 4 可以看出,GPx 的活性有一个先上升后下降的趋势,在 12 h 时极显著高于对照组($P<0.01$),24 h 时开始低于对照组,并在 162 h 时显著低于对照组($P<0.05$)。

从图 5 可以看出,GR 的活性先受到抑制后得到诱导,2 h 和 12 h 时 GR 的活性显著低于对照组($P<0.05$),在 24 和 48 h 均极显著高于对照组($P<0.01$),162 h 时 GR 的活性与对照组的没有明显差异。

3 讨论

研究认为鱼类对 MCs 毒性的敏感性远低于哺乳动物,如小白鼠经 MCs 注射染毒时, LD_{50} 值一般在 50

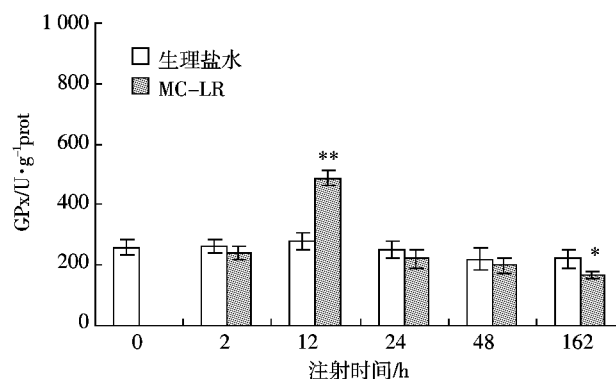


图 4 不同注射时间下罗非鱼肝脏中 GPx 活性

Figure 4 Glutathione peroxidase (GPx) activities in the liver of tilapia injected by MC-LR at different time

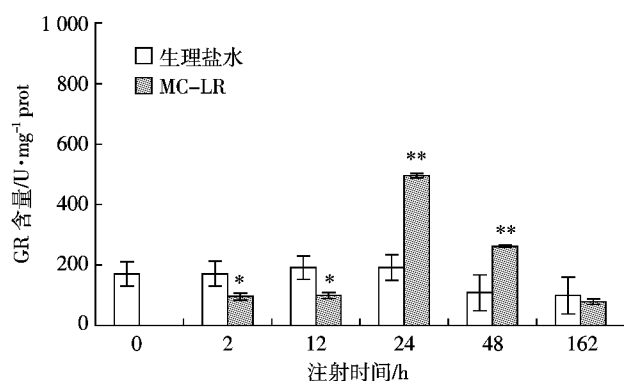


图5 不同注射时间下罗非鱼肝脏中GR活性

Figure 5 Glutathione reductase (GR) activities in the liver of tilapia injected by MC-LR at different time

$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 左右^[5],而鱼类经MCs注射染毒时, LD_{50} 值一般要大于 $500\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ^[6]。Prieto^[2]用 $500\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量的MC-LR和MC-RR做两种微囊藻毒素亚型结构对罗非鱼毒性的比较试验时,未发现鱼的死亡,本试验用 $500\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量也没有发现鱼的死亡,这与Prieto^[2]的研究结果一致。研究表明,在腹腔注射染毒条件下,MC-LR经毛细血管到心脏后,一部分会被转运到肝脏^[7];另一部分会随血液泵入到鳃^[8],然后经鳃又返回心脏,这部分MC-LR会被陆续地转运到肝脏进行解毒,因此MC-LR到达肝脏分为先后两个时间段。

MCs可以通过胆汁酸转运蛋白转运至肝脏,GST催化GSH与MCs的结合被认为是肝脏中MCs解毒的第一步^[4]。GSH一个重要的生理功能就是与外源化学物质发生结合而进行解毒,GSH的结合作用可能是通过为外源物质引入功能基团,将其转化为更具极性的物质,也可能使结合产物更具有亲水性,以水溶形态排除体外。无论是以什么形式结合,都势必造成GSH的消耗,为维持正常的生理功能和发挥解毒作用,GST、GR、 γ -GCS、GPx等与GSH相关的酶的活性也必然会发生一系列的变化。从图1可以看出,GST在2h和48h活性显著增加,这可能与需要用它来催化GSH与MC-LR的结合有关。

GSH与MC-LR的不可逆结合是GSH发挥其抗氧化作用的关键一步,这是因为处于还原状态的GSH在机体中能够保护许多蛋白质和酶分子中的巯基不被有害物质(如ROS)氧化,从而维持这些蛋白质和酶的正常生理功能。上述过程必然会造成GSH的逐步消耗,同时,GSH还可能在GPx催化下氧化为GSSG(氧化型谷胱甘肽)而造成GSH的消耗。GPx作为GSH的氧化酶在将GSH氧化为GSSG的过程

中发挥重要作用。从图4可以看出,12h时GPx活性的显著升高可能正是它发挥了这个作用。

机体在解毒过程中消耗了大量的GSH,为了维持解毒的需要,GSH必须不断地得到补充。其补充有两种途径:一种是通过GR的催化将GSSG还原为GSH;另一种就是GSH的从头合成,其中 γ -GCS是GSH合成循环中的限速酶^[9]。本试验中,随着暴露时间的增加,GSH有一个先下降后上升的过程,说明GSH在逐步消耗后得到了及时的补充,并且一直到最后还维持较高的水平,这可能与 γ -GCS一直保持较高的活性相关。在12h和48h时 γ -GCS活性显著高于同期对照组,这可能与MC-LR分两个时间段转运到肝脏有关。GSH在试验开始时(2h)就处于较高的水平,可能是GSH的消耗从一开始就加速了它的补充,以保证GSH足以结合不断进入肝脏的MC-LR。

GSH能够在GPx的催化下氧化为GSSG,同时,GSSG又能在GR的催化下还原为GSH。GPx与GR催化的反应属于一对可逆反应,这其中的两个反应在相互转化的过程中因为条件的改变彼此可能会有不同的催化速度。从图4和图5可以看出,试验前阶段(2~12h),由于GSH含量较高,此时由GR催化GSSG还原为GSH的反应会受到抑制,而由GPx催化GSH氧化为GSSG的反应则会受到诱导,因此该试验阶段呈现出GR活性降低、GPx活性升高的现象;但是随着MC-LR的进一步侵入并与GSH结合而造成GSH消耗的加剧,由GPx催化GSH氧化为GSSG的反应则会受到抑制,而由GR催化GSSG还原为GSH的反应会受到诱导,因此该试验阶段呈现出GPx活性降低而GR活性升高的现象。

4 结论

MC-LR能够对罗非鱼肝脏GSH及其相关酶产生明显影响。在MC-LR胁迫下,GSH呈先下降后上升趋势,总体上被诱导。罗非鱼肝脏 γ -GCS和GST在试验过程中出现两次显著升高现象,在GST作用下,GSH与MC-LR结合会造成GSH的消耗, γ -GCS和GR的活性增强能够使GSH含量升高,从而使罗非鱼肝脏GSH能够维持较高水平。

与对照组相比,GR的活性呈现在受到抑制后被诱导又逐渐恢复的趋势,而GPx呈现先被诱导后逐渐恢复的趋势。GPx与GR催化的反应属于一对可逆反应,这其中的两个反应在相互转化的过程中可能因

条件的改变有着不同的催化速度。它们能有效调节罗非鱼肝脏 GSH-GSSG 缓冲系统,从而在减轻或消除由 MC-LR 侵入而造成的肝细胞氧化胁迫中发挥重要作用。

参考文献:

- [1] Svrcak C, Smith D W. Cyanobacteria toxins and the current state of knowledge on water treatment options: A review[J]. *J Environ Eng Sci*, 2004, 3:155-185.
- [2] Prieto A I, Jos A, Pichardo S, et al. Differential oxidative stress responses to microcystins LR and RR in intraperitoneally exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.)[J]. *Aquatic Toxicology*, 2006, 77:314-321.
- [3] Fisher W J, Dietrich D R. Pathological and biochemical characterization of microcystin-induced hepatopancreas and kidney damage in carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2000, 164:73-81.
- [4] Jos A, Pichardo S, Prieto A I, et al. Toxic cyanobacterial cells containing microcystins induce oxidative stress in exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.) under laboratory conditions[J]. *Aquatic Toxicology*, 2006, 72:261-271.
- [5] Zurawell R W, Chen H, Burke J M, et al. Hepatotoxic cyanobacteria: A review of the biological importance of microcystins in freshwater environments[J]. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 2005, 8(1):1-37.
- [6] Kotak B J, Semalulu S, Friyta D J, et al. Hepatic and renal pathology of intraperitoneally administered microcystin-LR in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Toxicon*, 1996, 34:517-525.
- [7] Li L, Xie P, Chen J. In vivo studies on toxin accumulation in liver and ultrastructural changes of hepatocytes of the phytoplanktivorous bighead carp i. p.-injected with extracted microcystins[J]. *Toxicon*, 2005, 46:533-545.
- [8] Williams D E, Kent M L, Andersen R J, et al. Tissue distribution and clearance of tritium-labeled dihydro microcystin-LR epimers administered to Atlantic salmon via intraperitoneal injection [J]. *Toxicon*, 1995, 33:125-131.
- [9] 程 时, 丁海勤. 谷胱甘肽及其抗氧化作用今日谈[J]. 生理科学进展, 2002, 33(1):85-90.

CHENG Shi, DING Hai-qin. Glutathione and its antioxidation[J]. *Process in Physiological Science*, 2002, 33(1):85-90.