

微囊藻毒素-LR 的离体鳃灌流研究

张伟 谢平

(中国科学院水生生物研究所, 东湖湖泊生态系统试验站, 武汉 430072)

RESEARCH ON ISOLATED GILL PERFUSION WITH MICROCYSTIN-LR

ZHANG Wei and XIE Ping

(Donghu Experimental Station of Lake Ecosystems, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

关键词: 微囊藻毒素; 摄取; 排泄; 鳃灌流

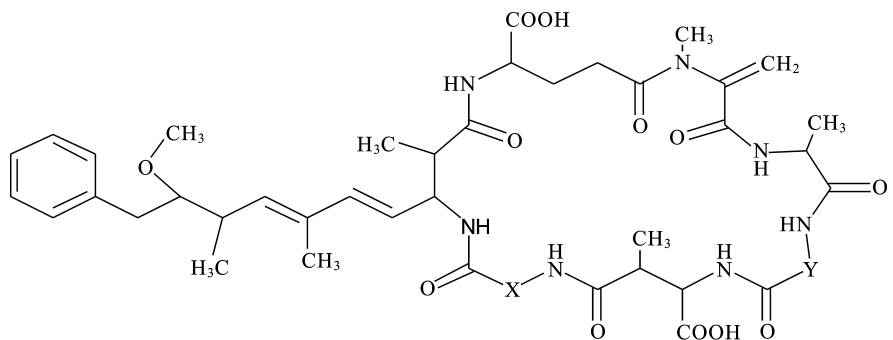
Key words: Microcystin; Intake; Excretion; Gill perfusion

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2013)04-0772-04

随着水体富营养化进程的加剧, 有毒蓝藻的频繁暴发已成为一个世界性的难题。自 1878 年 Francis^[1]报道了世界上首例由于接触有毒蓝藻而引发的牲畜中毒事件以来, 已经有许多关于鱼类、爬行动物、鸟类和哺乳动物接触蓝藻而中毒甚至死亡的案例^[2-5]。在为数众多的藻毒素中, 微囊藻毒素(Microcystins, MCs)因具有很强的肝毒性^[6, 7]和促癌作用^[8], 而被认为是最具危害的种类之一。MCs 是一类环七肽毒素(图 1), 由 5 个相对固定的氨基酸和 2 个可变氨基酸组成。现已鉴定的 MCs 多达八十余种^[9], 其中以 MC-LR 最为常见且相关的毒理学研究最多。在 WHO 给出的饮用水中的 MC-LR 临时指导值为 1 μg/L。

已有的关于 MCs 的毒理学研究中, 注射、浸泡和投喂是最为常见的 3 种染毒途径, 而其中又以浸泡和投喂最为接近鱼类自然状态下的 MCs 暴露途径。因为鱼类的鳃需要浸泡于水介质之中来实现气体交换, 所以浸泡染毒是排除了食性差异之外的一种无选择性的暴露途径。鱼类的鳃上皮由于仅由单层上皮构成且

具备多级结构, 极大地拓展了其表面积, 故而在气体交换、物质摄取和排泄上具有相当大的优势。Gaete, *et al.*^[10]研究了 MCs 对鲤鳃组织提取物的影响, 他们发现 MCs 能够抑制鳃上皮的离子转运通道, 其中以 Na⁺-K⁺-乌本苷敏感受体和 Na⁺-NaSCN 敏感 ATP 酶对 MCs 的暴露最为敏感。Zambrano and Canelo^[11]则在比较 MC-LR、铜绿微囊藻 MC-LR 粗提物以及冈田酸对鲤 (*Cyprinus carpio Linneo*) 鳃组织提取物的影响时发现, 这 3 种毒素不仅能阻止磷



MC-LR: X=Arg; Y=LeuCH₃

Arg=-(CH₂)₃-NH-(NH₂)C=NH₂; Leu: -CH₂-CH-(NH₂)₂

图 1 微囊藻毒素一般结构示意图

Fig. 1 Common structure of MCs

收稿日期: 2012-06-01; 修订日期: 2013-04-02

基金项目: 国家自然科学基金(31070457)资助

作者简介: 张伟(1987—), 男, 湖北武汉市人; 硕士; 主要从事淡水生态学研究。E-mail: zhangwei0203@yahoo.cn

通信作者: 谢平, 研究员; E-mail: xieping@ihb.ac.cn

酸化蛋白水解丝氨酸和苏氨酸残基, 而且还能抑制钠离子通道酶的天冬氨酸去磷酸化进程。一些学者认为 MCs 能通过鳃上皮摄取^[12, 13]。但是, 物质是否能够通过细胞膜取决于包括水溶性与脂溶性、分子量、电离度、物质的化学稳定性等在内的一系列的因素^[14, 15]。MCs 的物理化学性质似乎不太能够满足跨膜物质运输的要求。比如, MCs 的分子量偏大, 并且 MCs 在相当广泛的 pH 范围内都能够高度离子化^[16]。

迄今为止, 尚缺乏确凿可靠的证据来证明 MCs 能够通过鳃上皮组织进入或排出鱼体。因此, 在本实验中, 我们使用了离体的鳃组织灌流试验以确定 MC-LR 是否能够通过鳃被摄取和排泄, 并定量的描述这一过程。

1 材料与方 法

1.1 试剂

本实验中使用的 MC-LR 标准品购买自日本大阪的化学分析实验室。实验用毒素提取自采集于云南滇池的冻干微囊藻藻粉, 使用改进自 Ramanan, *et al.*^[17]的方法提取纯化, 提取的 MC-LR 纯度大于 95%。

1.2 离体鳃组织的制备

离体鳃组织的制备和灌流改进自 Rankin, *et al.*^[18]的方法。购买自武汉大学市场的鲜活健康鲢和鳙各 3 尾, 在实验前 30min 首先自尾静脉注射 5000 i.u. 的肝素钠。之后, 脊髓横断处死并小心的分离出鱼鳃。使用 1% 的 Ringer 溶液清洗鳃表面后, 入鳃和出鳃动脉均被小心的接上一段聚乙烯导管并用棉线绑缚以固定导管位置和防止漏液。离体鳃组织被导管悬挂浸泡于恒温(15 ± 0.5)°C 及充气的 100% 的 Ringer 溶液中, 并用 100% 的 Ringer 溶液小流速灌流 30min 以清除其中残留的血液组分。

1.3 MC-LR 的鳃组织摄取和排泄

MC-LR 的鳃组织摄取和排泄实验仪器配置(图 2)。准备好的鳃组织被转移到容器 A 中, 入鳃动脉端导管浸入容器 B, 整个过程中要非常小心的防止气泡进入导管。容器 B 中 100% 的 Ringer 溶液由蠕动泵以 1.0mL/min 的速度恒速输出, 经由导管入鳃和出鳃然后再回到容器 B。A、B 容器中各含有 200 mL 100% 的 Ringer 溶液且温度为(15 ± 0.5)°C。

在摄取试验中, MC-LR 被加入到容器 A 中, 使其浓度为 20 μg/mL, 容器 B 中则不加入 MC-LR。相反的, 在排泄试验中, 相同浓度 MC-LR 被加入到容器 B 中, 而容器 A 中不加 MC-LR。在开始灌流后的 1、5、10、20、30、40 和 60min, 分别从容器 A 和 B 中取出 50 μL 样品进行分析。每个测试均重复 3 次。

1.4 MC-LR 的定性与定量检测

MC-LR 和定量分析采用 Finnigan LCQ-AD 型液相色谱-质谱联用仪(LC-MS)。该仪器配有 ThermoSurveyor 自动进样器、Surveyor 液相泵、Surveyor PDA 检测器、Finnigan LCQ-Advantage MAX 离子阱质谱和电喷雾(ESI)离子源。仪器的控制、数据的分析和处理采用 Xcalibur 软件系统来实现, 检测限 0.01 μg/mL。

1.5 数据分析

数据使用 SPSS 进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 时差异显著。

2 结果与讨论

为了保证离体鳃组织的生物活性, 每个实验均限定在实验鱼处死后的 2h 内。实验鱼初始时的鳃组织和血液中并没有检测到有 MCs 的存在。

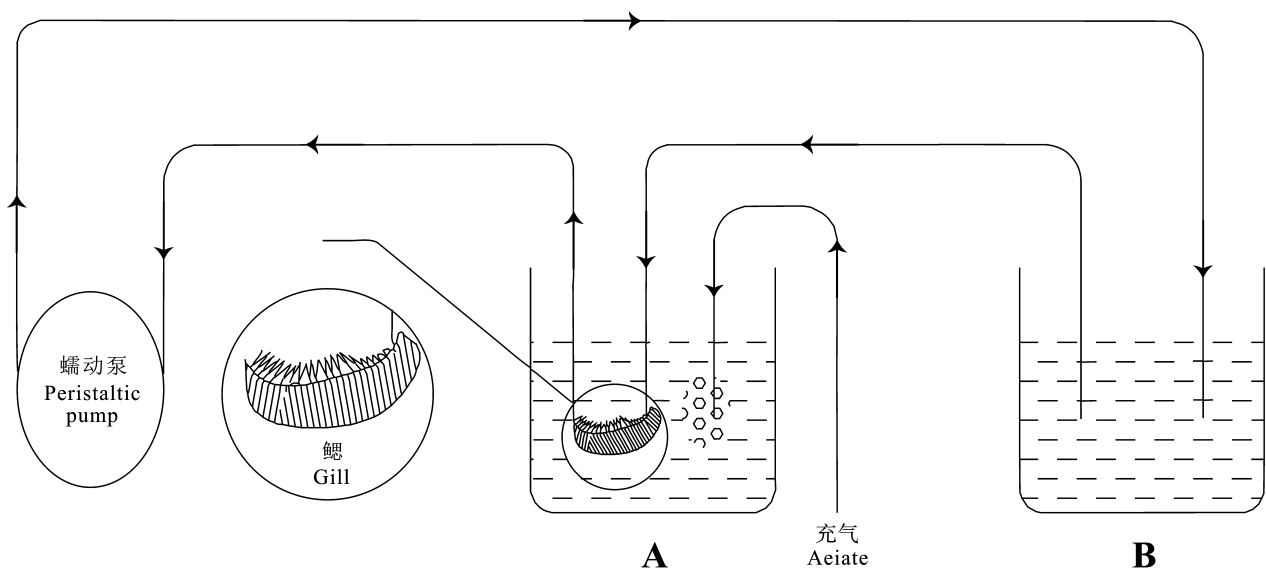


图 2 离体鳃灌流装置示意图
Fig. 2 Apparatus for gill perfusion

在本实验中,我们使用了离体鳃组织灌流来模拟鳃上皮对 MC-LR 的摄取和排泄,结果显示并没有可检测到的 MC-LR 穿过鳃上皮(表 1),数据统计也发现含有 MC-LR 的容器其浓度变化没有显著差异 ($P>0.05$),这说明 MC-LR 很难穿过鳃上皮。

关于物质的跨膜运输,Le Fevre^[19]曾总结认为任何显著带有电荷或者是非脂溶性,以及分子量大于 100 的物质,除非在胞膜表面有特殊的转运系统,否则几乎没有从细胞外部进入的可能。但是,后来的一些实验证明鳃在物质的通透性上有很大的自由度(Flexible)。比如,三卡因间氨基苯酸乙酯甲磺酸盐(MS-222)分子量为 222,水脂两亲,在不需要特殊载体的情况下也能迅速地经由自由扩散穿过鱼鳃进入鱼体^[15]。从生理结构上来看,鱼类的鳃因为仅有单层上皮覆盖,多级立体结构极大的扩张了吸收表面积,并且以逆流交换的方式进行气体交换,所以具有极高的交换效率。这些特点也使鳃在物质的摄取和排泄方面具有相当的优势。20 世纪 70 年代以来,就已经基本确立了鳃是鱼类药物进入和排泄的主要途径之一^[20, 21]。

大量研究表明,肝脏是 MCs 的主要作用靶器官^[22,23]。Robinson, *et al.*^[22]用氘标记的 MC-LR 对大西洋鲑进行腹腔注射实验发现,MC-LR 主要集中在肝脏中,并且最大毒素浓度出现在注射后 5h。Eriksson, *et al.*^[24]发现肝细胞吸收 MC-LR 能够被胆汁酸转运抑制剂如蕈环十肽,溴磺酞酞以及利福平所抑制。当将肝细胞与胆酸盐(胆酸和牛磺胆酸)一起孵育时 MC-LR 吸收的也减少,并且这种减少呈剂量依赖关系,所以他们认为 MC-LR 的转运可能存在一种主动运输机制。Fischer, *et al.*^[25]报道了多种有机阴离子转运受体(Organic anion transporting polypeptides, OATPs)在 MC-LR 向肝脏转运富集过程中起重要作用,并且他们提出 OATP1b2、OATP1B1 和 OATP1B3 这 3 种转运体对 MC-LR 向肝细胞的转运中起着直接的作用。显然,据我们所知鳃组织上并不存在这种受体,也就是说鳃组织不可能通过该转运体主动的运输进入血液。浸泡实验也证实,使用高浓度的 MCs 浸泡对鲑鳟鱼都无毒性反应^[26]。所以在自然状态下,MCs 主要还是通过胃肠道摄取而不太可能是通过鳃上皮渗透进入鱼体的。

表 1 鲢鳙离体鳃组织 MC-LR 灌流实验结果
Tab. 1 Results of Big head carp & Silver carp isolated gill perfusion

时间 Time (min)	鲢 Silver carp (<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>)				鳙 Bighead carp (<i>Aristichthys nobilis</i>)			
	摄取 Intake		排泄 Excretion		摄取 Intake		排泄 Excretion	
	A	B	A	B	A	B	A	B
1	20.97	0	0	20.59	20.46	0	0	20.06
	19.77	0	0	20.53	20.17	0	0	20.49
	20.75	0	0	19.97	20.07	0	0	20.03
5	19.75	0	0	20.21	20.26	0	0	19.64
	19.99	0	0	20.28	19.89	0	0	20.16
	19.98	0	0	20.25	19.55	0	0	20.01
10	19.92	0	0	19.58	19.89	0	0	19.84
	20.67	0	0	20.38	20.55	0	0	20.39
	20.46	0	0	20.15	20.24	0	0	19.88
20	20.33	0	0	20.09	20.36	0	0	20.61
	19.59	0	0	20.08	20.02	0	0	20.17
	20.31	0	0	20.21	20.06	0	0	19.98
30	20.30	0	0	20.07	20.38	0	0	19.82
	20.20	0	0	20.04	19.59	0	0	20.58
	20.16	0	0	19.67	20.33	0	0	19.91
40	20.12	0	0	20.08	19.69	0	0	20.47
	20.05	0	0	19.95	19.96	0	0	20.09
	20.74	0	0	19.94	20.25	0	0	19.56
60	20.02	0	0	19.72	19.38	0	0	19.88
	19.91	0	0	20.50	19.63	0	0	19.93
	19.80	0	0	19.77	19.60	0	0	19.84

注: A, B 分别代表特定时间点时,从容器 A 和 B 取出并测定的 MC-LR 浓度,单位 $\mu\text{g/mL}$ 。每个实验均设有三个平行

Note: A and B represent the MC-LR concentration in container A and B at each time point with the unit of $\mu\text{g/mL}$. Three duplicate were set at each time point

3 结论

在本实验中发现, 离体鳃组织灌流中 MC-LR 既不能从外部通过鳃上皮摄取进入体内, 也不能从体内排泄至鳃组织外部, 所以我们认为鳃不能成为 MC-LR 的摄取和排泄途径。MC-LR 在跨膜运输中受以下几点条件的制约: (1)分子量过大, 超过了小分子自由渗透的限度; (2)在相当广泛的 pH 条件下分子均能高度离子化, 明显带有电荷阻碍了分子的跨膜运输; (3)鳃上皮组织中缺乏已知的 MC-LR 胆汁酸转运系统, 无法实现毒素的主动运输。

参考文献:

- [1] Francis G. Poisonous Australia lake [J]. *Nature*, 1878, **18**: 11—12
- [2] Carbis C R, Simons J A, Mitchell G F, *et al.* A biochemical profile for predicting the chronic exposure of sheep to *Microcystis aeruginosa*, an hepatotoxic species of blue-green alga [J]. *Research in Veterinary Science*, 1994, **57**(3): 310—316
- [3] Chen J, Zhang D W, Xie P, *et al.* Simultaneous determination of microcystin contaminations in various vertebrates (fish, turtle, duck and water bird) from a large eutrophic Chinese lake, Lake Taihu, with toxic *Microcystis* blooms [J]. *Science of the Total Environment*, 2009, **407**(10): 3317—3322
- [4] Mohamed Z A, Carmichael W W, Hussein A A. Estimation of microcystins in the freshwater fish *Oreochromis niloticus* in an Egyptian fish farm containing a *Microcystis* bloom [J]. *Environmental Toxicology*, 2003, **18**(2): 137—141
- [5] Zhang B J, Li X Y. Prolongsub-chronicexposedtomicrocystiscellextract results ion oxidative stress in mice liver [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, **33**(6): 1088—1094 [张榜军, 李效宇. 微囊藻细胞抽提物亚慢性暴露导致小鼠肝脏氧化应激. 水生生物学报, 2009, **33**(6): 1088—1094]
- [6] Dawson R. The toxicology of microcystins [J]. *Toxicol*, 1998, **36**(7): 953—962
- [7] Sun Y, Huang P, Xu L H. Microcystin-LR induces phosphorylation of ERK and JNK in human hepatocyte HL7702 [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, **35**(1): 180—182 [孙瑜, 黄朴, 徐立红. 微囊藻毒素 LR 影响人肝细胞 HL7702 的 ERK 及 JNK 的蛋白磷酸化. 水生生物学报, 2011, **35**(1): 180—182]
- [8] Nishiwaki-Matsushima R, Ohta T, Nishiwaki S, *et al.* Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR [J]. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 1992, **118**(6): 420—424
- [9] Dietrich D, Hoeger S. Guidance values for microcystins in water and cyanobacterial supplement products (blue-green algal supplements): a reasonable or misguided approach [J]? *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2005, **203**(3): 273—289
- [10] Gaete V, Canelo E, Lagos N, *et al.* Inhibitory effects of *Microcystis aeruginosa* toxin on ion pumps of the gill of freshwater fish [J]. *Toxicol*, 1994, **32**(1): 121—127
- [11] Zambrano F, Canelo E. Effects of microcystin-LR on the partial reactions of the Na⁺-K⁺ pump of the gill of carp (*Cyprinus carpio* Linneo) [J]. *Toxicol*, 1996, **34**(4): 451—458
- [12] Zhang D W, Xie P, Liu Y Q, *et al.* Transfer, distribution and bioaccumulation of microcystins in the aquatic food web in Lake Taihu, China, with potential risks to human health [J]. *Science of the Total Environment*, 2009, **407**(7): 2191—2199
- [13] Malbrouck C, Kestemont P. Effects of microcystins on fish [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2006, **25**(1): 72—86
- [14] Keberle H. Physico-chemical factors of drugs affecting absorption, distribution, and excretion [J]. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, 1971, **29**(s3): 30—47
- [15] Ferreira J T, Schoonbee H J, Smit G L. The uptake of the anaesthetic benzocaine hydrochloride by the gills and the skin of three freshwater fish species [J]. *Journal of Fish Biology*, 1984, **25**(1): 35—41
- [16] De Maagd P G, Hendriks A J, Seinen W, *et al.* pH-Dependent hydrophobicity of the cyanobacteria toxin microcystin-LR [J]. *Water Research*, 1999, **33**(3): 677—680
- [17] Ramanan S, Tang J, Velayudhan A. Isolation and preparative purification of microcystin variants [J]. *Journal of Chromatography A*, 2000, **883**(1—2): 103—112
- [18] Rankin J, Maetz J. A perfused teleostean gill preparation: vascular actions of neurohypophysial hormones and catecholamines [J]. *Journal of Endocrinology*, 1971, **51**(4): 621
- [19] Le Fevre P G. Absorption, distribution, transformation and excretion of drugs [J]. *Springfield*, 1972, 5—38
- [20] Hunn J B, Allen J L. Movement of drugs across the gills of fishes [J]. *Annual Review of Pharmacology*, 1974, **14**(1): 47—54
- [21] Houston A, Woods R. Influence of temperature upon tricaine methane sulphonate uptake and induction of anesthesia in rainbow trout (*Salmo Gairdneri*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 1976, **54**(1): 1—6
- [22] Robinson N A, Pace J G, Matson C F, *et al.* Tissue distribution, excretion and hepatic biotransformation of microcystin-LR in mice [J]. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1991, **256**(1): 176—182
- [23] Williams D M, Kent M L, Andersen R J, *et al.* Tissue distribution and clearance of tritium-labeled dihydromicrocystin-LR epimers administered to Atlantic salmon via intraperitoneal injection [J]. *Toxicol*, 1995, **33**(2): 125—131
- [24] Eriksson J E, Grönberg L, Nygård S, *et al.* Hepatocellular uptake of 3H-dihydromicrocystin-LR, a cyclic peptide toxin [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1990, **1025**(1): 60—66
- [25] Fischer W J, Altheimer S, Cattori V, *et al.* Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2005, **203**(3): 257—263
- [26] Tencalla F G, Dietrich D R, Schlatter C. Toxicity of *Microcystis aeruginosa* peptide toxin to yearling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 1994, **30**(3): 215—224