

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897-20140306001

李莉,雷和花,侯杰,等.微囊藻毒素在银鲫肠道中的累积及其病理学影响[J].生态毒理学报,2014,9(6):1189-1196

Li L, Lei H H, Hou J, et al. Intestinal accumulation and pathological effects of microcystins in crucian carp (*Carassius auratus* L.) [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2014, 9(6): 1189-1196 (in Chinese)

微囊藻毒素在银鲫肠道中的累积及其病理学影响

李莉^{1,*}, 雷和花², 侯杰¹, 龙萌¹, 苏玉晶¹, 吴宁¹

1 华中农业大学水产学院 农业部淡水生物繁育重点实验室 淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心 武汉 430070

2 中国科学院武汉物理与数学研究所 武汉 430071

收稿日期: 2014-03-06 录用日期: 2014-04-04

摘要: 银鲫(*Carassius auratus*) 杂食性鱼类 是我国淡水主养品种之一。在富营养化湖泊中,它能以有毒微囊藻为主要食物,导致微囊藻毒素(MCs)在其组织中大量累积。为研究 MCs 在肠道内累积和代谢特征及其对肠道的毒性影响,分别以 50 和 200 $\mu\text{g MC-LReq}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量的 MCs 粗提液(主要含 MC-RR 和 MC-LR)对银鲫进行腹腔注射,并在注射后 1、3、12、24、48 和 168 h 后取样。MCs 的含量用 LC-MS 和 HPLC 进行定性和定量测定 结果发现 高低两剂量组银鲫肠中 MCs 的含量均在注射后 1 h 达最大值(分别为 2.8 和 181.4 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ DW) 然后随暴露时间的延长迅速下降。相对于毒素的累积,MCs 诱导的银鲫肠组织损伤具滞后性,注射后 48 h 内 高低两剂量组肠道的病理变化呈时间-剂量依赖性的增长,病理特征表现为肠上皮细胞排列紊乱,甚至出现坏死、溶解和脱落,杯状细胞数目显著增多,微绒毛结构破坏并伴随淋巴细胞浸润。实验结果表明,单次染毒后 MCs 在鲫肠道中迅速累积后降解,并造成时间-剂量依赖性组织损伤,且低剂量组的损伤是可逆的。

关键词: 微囊藻毒素(MCs); 银鲫; 肠道; 毒性效应

文章编号: 1673-5897(2014)6-1189-08 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Intestinal Accumulation and Pathological Effects of Microcystins in Crucian Carp (*Carassius auratus* L.)

Li Li^{1,*}, Lei Hehua², Hou Jie¹, Xue Ting¹, Long Meng¹, Su Yujing¹, Wu Ning

1. Fisheries College of Huazhong Agricultural University; Key Laboratory of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture; Freshwater Aquaculture Collaborative Innovation Center of Hubei Province, Wuhan 430070, China

2. Wuhan Institute of Physics and Mathematics, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China

Received 6 March 2014 **accepted** 4 April 2014

Abstract: Crucian carp (*Carassius auratus* L.) , an omnivorous fish , is a dominant fresh-water species in China. This carp can ingest a significant portion of toxic cyanobacteria in eutrophic lakes , leading to microcystins (MCs) accumulation in its tissues. To study the dynamics and toxic effects of MCs in the gastrointestinal tract , an acute toxic experiment was conducted in crucian carp injected intraperitoneally (i. p.) with extracted MCs (containing MC-RR and MC-LR mainly) at the doses of 50 μg and 200 $\mu\text{g MC-LReq}\cdot\text{kg}^{-1}$ respectively , and samples were taken at 1 , 3 , 12 , 24 , 48 and 168 h after injection respectively. Quantitative and qualitative determinations of MCs in the intestinal tract were conducted by HPLC and LC-MS , respectively. The MCs concentrations in the intes-

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31100378; No. 51179134); 湖北省自然科学基金(No. 2014CFB938); 中央高校基本科研业务费专项资金资助(No. 2010QC022)

作者简介: 李莉(1978-) 女 博士 副教授 研究方向为水产品质量安全 E-mail: foreverlili78@mail.hzau.edu.cn

tinal tract reached the maxima (2.8 and 181.4 ng MC-RR \cdot g⁻¹ dry weight for the 50 and 200 μ g MC-LReq \cdot kg⁻¹ dose groups respectively) at 1 h post-injection, followed by sharp declines afterwards, whereas the pathological changes of the intestinal tract in both dose groups progressively increased within 48 h, including disorganization, necrosis, lysis and even exfoliation of intestinal epithelial cells, an increase of the number of goblet cells, loss of the structure of intestinal microvilli and the presence of infiltrating lymphocytes. This study suggested that MCs were quickly accumulated in the intestinal tract of crucian carp after a single injection and then degraded progressively, which caused intestinal pathological damage in a time and dose dependent manner. Moreover, recovery was observed in the intestinal tract in the 50 μ g MC-LReq \cdot kg⁻¹ dose group at 168 h post-injection.

Keywords: microcystins (MCs); crucian carp; intestinal tract; toxic effects

日趋严重的水体富营养化引起有害蓝藻水华的频发已成为全球性普遍关注的环境问题^[1-3]。有害水华污染所带来的主要危害是有毒蓝藻细胞破裂后向水体中释放多种不同类型的藻毒素,如微囊藻毒素(microcystins, MCs)、神经毒素、脂多糖内毒素等。在已发现的各种不同藻毒素中,MCs 是一类出现频率最高、产生量最大和造成危害最严重的藻毒素^[4-5]。MCs 是环状七肽化合物,基本结构是环 D-丙氨酸-L-X-赤- β -甲基-D-异天冬氨酸-L-Y-Adda-D-谷氨酸-N-甲基脱羟基丙氨酸, X、Y 为两种可变的 L-氨基酸,其变化可产生多种 MCs,至今已发现 MCs 有 80 多种异构体^[6]。随着有关 MCs 毒性研究的深入开展,发现 MCs 除较强的肝毒性外,还具有肾毒性、肠毒性、免疫毒性等,是一种多器官毒性物质^[7-9]。

近年来,因蓝藻污染水源和/或 MC-LR 直接引起胃肠疾病的报道不断增多^[10-12],人们对 MCs 的肠毒性也越发重视。在巴西一次水源性胃肠炎爆发中 2 000 例病人中有 88 人死亡,这次事件被高度的怀疑与 MCs 污染水源有关^[13]。1994 年, Falconer 等^[14]首次用 MCs 处理离体鸡小肠细胞,结果发现经过 MCs 作用的小肠细胞发生变形,细胞表面长出一个或多个泡,研究也指出与摄入微囊藻相关的胃肠炎的产生可能反映了 MCs 对肠上皮细胞的损伤。相似的, Botha 等^[15] 2004 年用 MC-LR (50 μ mol \cdot L⁻¹) 处理离体 CaCo2 肠细胞系,结果发现 MC-LR 能降低 CaCo2 肠细胞活性,诱导肠细胞时间依赖性凋亡。同年, Botha 等^[8] 采用腹腔注射的方法研究了 MC-LR 对 Balb/c 小鼠在体肠道的影响,结果表明 MC-LR 能诱导时间依赖性的十二指肠,空肠,回肠细胞凋亡,而免疫组化的结果显示 MC-LR 主要累积在肠微绒毛。在鱼类急性口喂毒性试验中, Atencio

等^[16] 2008 年通过光镜和电镜的观察到了丁鲷(Tinca tinca) 肠上皮细胞空泡化、核固缩,甚至微绒毛的丢失; Trinchet 等^[17] 2011 年指出 MC-LR 可引起青鳉(Oryzias latipes) 幼鱼消化道损伤,主要表现为肠上皮细胞的连接丢失(特别是紧密连接和桥粒),细胞溶解,上皮细胞微绒毛破坏,杯状细胞减少。然而, Falconer 等用水华污染的含 MCs 的水重复饲喂猪,却并未引起猪肠道细胞的任何损伤^[18]。Falconer 和 Humpage 研究也指出^[19] 与不添加毒素的对照组相比,即使预先加入癌症诱剂 N-Methyl-N-nitroso-urea, MC-LR 也不会促进小鼠十二指肠癌的形成,这与 MC-LR 能引起人胃肠疾病相矛盾^[10, 12]。由此可见,有关 MCs 肠毒性影响的研究在时间上、对象上明显不集中,不连续,多停留于现象观察,非常缺乏 MCs 在肠道中的累积和代谢特征的研究。

鱼类作为水生态系统的次级消费者,藻毒素可能通过直接的摄食活动或生物累积作用在鱼体中累积下来,继而再通过食物链危害到人类健康^[20-22]。银鲫(Carassius auratus L.) 是杂食性鱼类,自然水体中的银鲫以微囊藻为主要食物,微囊藻可占鲫鱼食物体积的绝大部分^[23]。由于腹腔注射的藻毒素能较好的定量,实验条件可控性强,所以常作为一种主要的染毒方式^[9, 24-25]。因此,本研究以我国淡水主养品种之一的银鲫为试验对象,通过腹腔注射不同剂量 MCs 粗提液,探讨 MCs 在银鲫肠道内的累积和代谢规律及其对肠道组织学影响的剂量-效应关系,对评价 MCs 肠毒性及其水生生态风险具有重要的理论意义和应用价值。

1 材料和方法(Material and methods)

1.1 粗提液的制备和藻毒素含量的测定

试验所用的冻干藻粉采集自云南滇池。MCs 粗提液制备参照 Harada 的方法^[26] 略加修改。称取一

定量冻干藻粉,用5%的乙酸提取3次,得到的悬浊液离心取上清液,并通过预处理的 C_{18} 柱吸附(预处理先用100%甲醇冲洗,后用去离子水冲洗),随后清洗 C_{18} 柱,先用20%甲醇洗一次,再用100%甲醇洗脱毒素。将100%甲醇洗脱液在旋转蒸发仪上蒸发干燥,然后用甲醇(色谱纯)定容,在减压装置上蒸干,此干粉即为粗微囊藻毒素。将粗毒素于 -20°C 冰箱保存备用。

将以上定容后的样品,用带ODS柱(Cosmosil 5C18-AR 4.6×150 mm, Nacalai, Japan)和SPD-20A的紫外分光光度检测器的高效液相色谱仪(HPLC)分析藻毒素的含量。检测波长238 nm,柱流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,用含0.05%三氟乙酸(TFA)的甲醇梯度洗脱,在25 min内甲醇的浓度从50%升到70%。以商业购得藻毒素MC-LR、MC-RR和MC-YR(Wako Pure chemical Industries, Japan)为标样,通过紫外光谱和保留时间确定藻毒素含量。此MCs提取液中MC-YR很少,不足以定量。MCs提取液最后稀释成含 $136.5 \mu\text{g MC-RR} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $22.7 \mu\text{g MC-LR} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液用于注射,其中MC-RR和MC-LR的比例约为6:1, HPLC检测纯度 $>80\%$ 。

1.2 试验鱼类

试验所用银鲫从华中农业大学水产站购买,选取健康、体质健壮的银鲫180尾,平均体重为 $265.0 \pm 22.6 \text{ g}$,平均体长为 $19.53 \pm 1.16 \text{ cm}$,随机分成3组,各组60尾。试验前将鱼暂养在150 L水族箱中14 d,按鱼体重的2.0%投喂商品鲫鱼饲料,试验前的48 h停止投喂。水源为曝气除氯的自来水,并用充氧泵不断充氧,试验期间水温为 $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$,溶氧保持在 $6.0 \sim 7.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.3 LD_{50} 测定

根据Fawell等^[27]的up-down方法测定微囊藻粗提液对银鲫的半致死剂量(LD_{50}),并依此来确定对银鲫的染毒剂量。

1.4 鱼类的染毒与采样

鱼类染毒采用腹腔注射,注射方式为沿胸鳍下腹中线注射入腹腔,采用0.9%生理盐水作为MCs溶剂,将已制备好的MCs粗提液稀释为相应的浓度。根据Gupta等^[28]的研究(腹腔注射MC-RR对大鼠48 h的 LD_{50} 约为MC-LR的 LD_{50} 5倍)将MC-RR折算成MC-LR。本实验选取 $0.2LD_{50}$ 和 $0.8LD_{50}$ 两个剂量,即注射剂量分别为50和 $200 \mu\text{g MC-LReq} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ body weight (bw)}$,称为低剂量组和高剂

量组。对照组注射等量的生理盐水。分别在注射后1、3、12、24、48和168 h进行采样,每个时间点各染毒组和对照组各取3尾鱼,用浓度为0.02%的MS-222麻醉,称体重,解剖后迅速取出肠道,每次均在距肠道第一回折处约50 mm处切取小段中肠组织(约3 mm),立即放入10%中性甲醛中固定,用于观察组织病理变化,剩余部分迅速用生理盐水冲洗,冻存于 -70°C 用于测定肠道中的毒素。每个采样时间点记录染毒组和对照组鲫死亡情况,并将死亡鲫取出,因 $200 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组的鲫在约60 h全部死亡,168 h仅有对照组和 $50 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组的鲫。

1.5 肠中毒素的提取和测定

肠道中MCs的提取和分析参照Xie等方法^[29]。将鱼肠道在冷冻干燥器上冻干后称重,按BuOH:MeOH:H₂O=1:4:15加入10 mL混合液,室温下置于摇床上振荡抽提24 h,于 4°C $18\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心30 min,取上清;残渣加入等量以上混合液继续抽提。重复两次后,将3次上清液混合,并通过已预处理的 C_{18} 固相萃取柱吸附(预处理先用50 mL 100%甲醇冲洗,后用50 mL去离子水冲洗),随后清洗 C_{18} 柱,先用25%甲醇洗一次,再用100 mL 90%甲醇洗脱下毒素。将90%甲醇洗脱液在旋转蒸发仪上蒸发干燥,然后用5 mL 100%甲醇完全溶解后直接过硅胶柱(需预处理,即用10 mL 100%甲醇冲洗),再用20 mL 70%甲醇洗脱。将此洗脱液在旋转蒸发仪上蒸干,用纯甲醇定容,经反相HPLC测定MCs含量。检测波长238 nm,柱流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,用含0.05%的三氟乙酸(TFA)的甲醇梯度洗脱,在25 min内甲醇的浓度从50%上升到70%。用商业购得藻毒素标样MC-RR和MC-LR(Wako Pure chemical Industries, Japan)通过紫外光谱和保留时间确定藻毒素的含量。

另外,藻毒素定性在Finnigan高效液相色谱/质谱联用仪(LC-MS)上确定。该仪器配有热测量自动进样器,MS泵测量器,PDA系统测量器,带有电喷射离子源(ESI)气体压力离子化器的Finnigan LCQ-Advantage MAX离子阱。该仪器的控制、数据处理和分析是用Xcalibur软件,分离是在Agilent Zorbax SB-C18($2.1 \text{ mm i. d.} \times 100 \text{ mm}$)反向柱上完成。自动进样,进样量为 $10 \mu\text{L}$,流动相为乙腈(含0.05%甲酸)和水(含0.05%甲酸),梯度洗脱程序由30%(V/V)乙腈(含0.05%甲酸)在3 min内上升至40%(V/V),再在3 min内上升至70%(V/V),保持

8.5 min 再在 1 min 内回到 30% (V/V), 流速 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长 238 nm。LC-MS 的条件为: ESI 的喷射电压是 4.54 kV, 护套气体流速为 20 个单位, 辅助气体流速为 0 个单位, 毛细血管电压 3.36 V, 毛细血管温度 250°C 。数据的获得是通过全质量模式阳离子质心方法, 质谱扫描范围为 400 ~ 1100。

1.6 肠道光镜样品制备及观察

中肠组织小片固定于 25 倍体积的 10% 福尔马林, 于 24 h 内进行常规梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, Leica RM2135 切片机 (Leica 公司, 德国) 连续切片, 厚度为 $6 \mu\text{m}$, 苏木精和伊红 (HE) 染色, 脱水封片, Zeiss 显微镜 (Axioplan-2 imaging, 美国) 下观察肠道组织的变化, 并进行拍照分析。

2 结果 (Results)

2.1 LD_{50} 、死亡率和中毒症状的观察

测得腹腔注射 MCs 对鲫 48 h 的 LD_{50} 为 $250 \mu\text{g MC-LReq} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ bw}$ 。试验过程中, 低剂量组和对照组没有鲫死亡; 高剂量组中在染毒后 12、24 和 48 h 采样点分别有 3、5、11 尾鲫死亡, 注射后 60 h 实验鱼死亡率达 100%。

高剂量组鱼死亡时主要表现为: 腹部肿胀、朝上, 解剖后可见腹部大量积水, 肝、肾组织颜色变浅, 变软。注射后 1 ~ 3 h, 高低两剂量组鱼均表现出不安、烦躁的症状, 随后在注射后 12 ~ 24 h, 鱼类行动变迟缓, 鱼体失去平衡, 鳃的呼吸频率增加, 并伴有突然的狂游现象。这种现象随着时间的增加变得更明显, 并且在高剂量组表现得比低剂量组更严重。注射后 24 ~ 48 h, 高剂量组鱼经常游到接近水面处, 要么身体平侧向一边或头朝下垂直游动, 鳃的呼吸频率和幅度也逐渐降低。然而在低剂量组很少看到这样的现象。相比之下, 对照组仅在注射后 1 h 表现出轻微的不安, 之后就恢复正常的游泳行为。

2.2 肠道内藻毒素的含量

从图 1 可以看出, 高低两剂量组中, 银鲫肠中 MC-RR 累积随暴露时间的延长逐渐减少, 然而在银鲫肠中未检测到 MC-LR。注射后 1 h, 高低两剂量组银鲫肠中藻毒素含量最高, 分别达 2.8 和 $181.4 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{ dry weight (DW)}$ 。注射后 48 h, 低剂量组银鲫肠中的藻毒素含量为 $1.8 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DW}$, 高剂量组的为 $3.2 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DW}$ 。注射后 168 h, 低剂量组银鲫肠中的 MCs 含量为 $0.8 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DW}$ 。

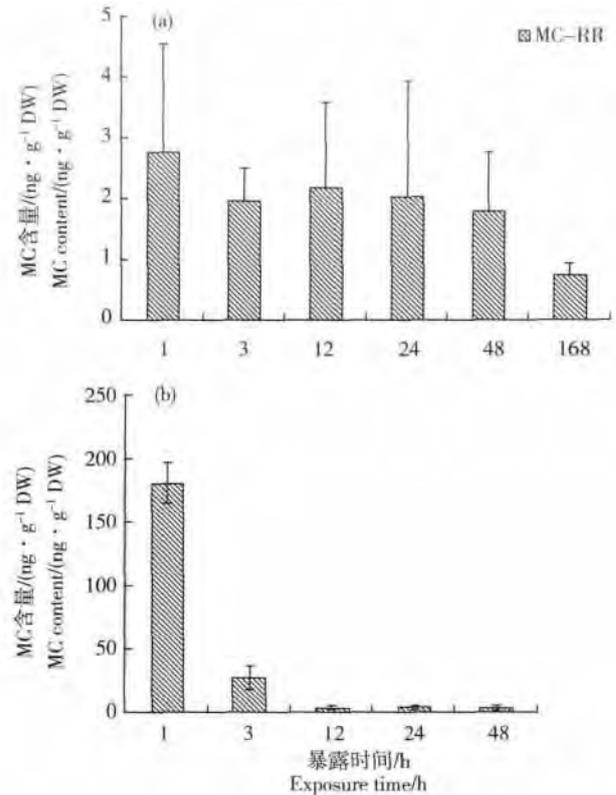


图 1 用 MCs 粗提液分别以 50 (a) 和 $200 \mu\text{g MC-LReq} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ bw}$ (b) 的剂量注射染毒后银鲫肠中 MCs 含量的经时变化。

Fig. 1 MCs concentrations in the intestinal tract of crucian carp after i. p. injection with MCs equivalent to (a) 50 and (b) $200 \mu\text{g MC-LReq} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ bw}$, respectively.

2.3 微囊藻毒素导致银鲫肠道的病理变化

光镜下观察对照组银鲫鱼肠道, 肠壁由四层构成: 粘膜层、粘膜下层、肌层和浆膜层。粘膜层微绒毛长, 高倍镜下可见肠上皮细胞呈高柱状, 核椭圆, 位于细胞基部, 细胞游离面的微绒毛排列整齐、密集 (图 2 I)。低剂量组在注射后 1 ~ 12 h, 肠上皮细胞变化不明显, 主要表现为肠腺和杯状细胞数量增加 (图 2 II); 注射后 24 ~ 48 h, 微绒毛排列变得很不规则, 肠上皮细胞排列紊乱, 部分上皮微绒毛脱落, 杯状细胞继续增多伴随淋巴细胞浸润 (图 2, III)。注射后 168 h, 肠上皮损伤修复, 微绒毛排列规则 (图 2 IV)。

高剂量组在注射 1 h 后, 观察到肠上皮内淋巴细胞上移明显 (图 3 I)。注射后 3 ~ 12 h, 肠上皮细胞排列紊乱, 杯状细胞和淋巴细胞增加, 部分绒毛顶端充血 (图 3 II)。注射后 24 ~ 48 h 后, 肠上皮微绒毛排列紊乱, 部分上皮细胞变性、坏死甚至脱落, 淋

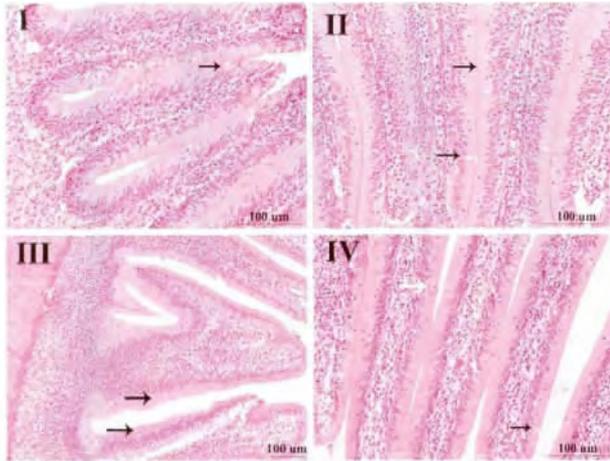


图 2 对照组和用 MCs 粗提液以 $50 \mu\text{g MC-LReq} \cdot \text{kg}^{-1} \text{bw}$ 的低剂量注射染毒后银鲫肠道 H. E 染色切片: I ,对照组; II , 1 h; III , 24 h; IV , 168 h。黑色箭头示杯状细胞。白色箭头示淋巴细胞浸润。

Fig. 2 H&E stained sections of the intestinal tract from crucian carp injected i. p. with extract MCs equivalent to $50 \mu\text{g MC-LReq} \cdot \text{kg}^{-1} \text{bw}$ at the following times after dosing: I , control; II , 1 h; III , 24 h; IV , 168 h. Black arrows show the goblet cells. White arrows show infiltrating lymphocytes.

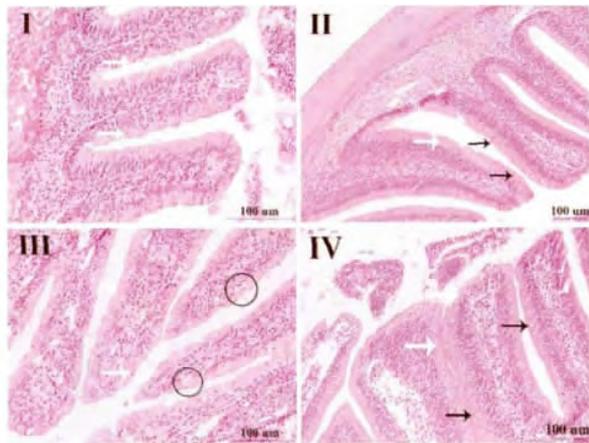


图 3 用 MCs 粗提液以 $200 \mu\text{g MC-LReq} \cdot \text{kg}^{-1} \text{bw}$ 的高剂量注射染毒后银鲫肠道的 H. E 染色切片: I , 1 h; II , 12 h; III , 24 h; IV , 48 h。黑色箭头示杯状细胞。白色箭头示淋巴细胞浸润。圆圈示肠上皮细胞溶解、脱落。

Fig. 3 H&E stained sections of the intestinal tract from crucian carp injected i. p. with extract MCs equivalent to $200 \mu\text{g MC-LReq} \cdot \text{kg}^{-1} \text{bw}$ at the following times after dosing: I , 1 h; II , 12 h; III , 24 h; IV , 48 h. White arrows show infiltrating lymphocytes. Circles show necrosis , lysis and exfoliation of epithelial cells.

巴细胞显著增加,固有层中空,微绒毛结构破坏并伴随淋巴细胞浸润(图 3 III-IV)。

3 讨论 (Discussion)

3.1 MCs 在鲫肠道累积和清除

鱼类处于水生生态系统的最高营养级,在出现有毒蓝藻水华的水体中,它们直接或间接的遭受到 MCs 的污染。有关 MCs 在鱼体内组织分布的研究已证实,无论经腹腔注射或经口染毒,均可在鱼的肝、肾、鳃、肠、肌肉,甚至脑中检测到 MCs^[30-36],其中大部分有关肠道 MCs 累积的报道都局限于测定肠含物或含肠含物的肠道,如 Mohamed 等^[30]于 2000 年 6 月检测到埃及某暴发铜绿微囊藻水华的鱼池中的尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 体内肠道 MCs 含量最高为 $821 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 湿重; Xie 等^[21]报道了 2003 年 9 月安徽巢湖 8 种不同营养级鱼类肠含物 MCs 含量平均为 $22\,000 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{DW}$; Kagalou 等^[31]报道了 2005 年 10 月希腊 Pamvotis 湖异育银鲫肠道中 MCs 的平均含量为 $233.51 \pm 196.5 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 湿重以及 Cazenave 等^[32]通过浸泡的方式研究了 MC-RR ($50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 在胡椒甲鲶 (*Corydoras paleatus*) 和四眼鱼 (*Jenynsia multidentata*) 的肠中的分布情况,相对而言,有关肠壁中 MCs 累积和代谢的研究非常缺乏,不能准确评价由于肠壁中 MCs 累积对鱼类可能带来的危害。2007 年,Chen 等^[33]在野外实验调查中发现,太湖原位围栏中滤食性鱊 (*Aristichthys nobilis*) 肠壁中 MCs 含量平均为 $1\,220 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{DW}$,分布由高到低分别是中肠壁、后肠壁和前肠壁,但相对肠含物中 MCs 含量要低得多。本实验结果显示,高低两剂量组银鲫肠中 MCs 含量均在注射后 1 h 最高 (高低剂量组分别达 2.8 和 $181.4 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{DW}$) ,并随暴露时间的延长 MCs 含量逐渐降低。本研究也测定了血液和其他器官组织 (包括心脏、肝、肾、脾、脑和性腺) 中 MCs 的含量,结果发现两剂量组血液中 MCs 含量均在注射后 1 h 达到最大值 (分别为 $3\,757 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{DW}$ 和 $270 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{DW}$) ,并随时间的延长逐渐下降,最终表现为各个组织器官不同的毒素含量水平,提示血液在毒素的运送中起到了很大的作用 (见已发表文章 Lei 等^[34])。相似的,Williams 等^[35]通过腹腔注射亚致死剂量的 $^3\text{H-MC-LR}$ ($0.1 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) 研究了 MC-LR 在大西洋鲑 (*Salmo salar*) 血液、肝、肾、鳃、肠和肌肉中的分布和迁移规律,结果证实 MC-LR 可以穿透细胞膜,进入血液,再通过血液传输,到达肠道、鳃等全身各部分器官。研究还发现,幽门盲囊和肠中 MC-LR 含量最高出现在注射后 2 h (约 $2.8 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 湿重),随着暴露时间的延长逐渐降

低,至注射后 46 h 代谢率为 93%。Li 等^[36]通过腹腔注射 MCs 粗提液研究 MC-LR 和 MC-RR 在鳙 (*Aristichthys nobilis*) 组织中累积和代谢规律时也发现,MC-LR 和 MC-RR 均可在肠道中累积,并且高低两剂量组中 MC-LR 和 MC-RR 的含量都随着暴露时间延长而降低。本实验结果表明,腹腔注射后 MCs 经血液进入各器官组织,包括肠道进行累积和代谢,由此产生毒性作用。本实验研究期间,肠道中只能检测到 MC-RR,始终未能检测到 MC-LR,这可能与肠道上皮细胞对 MCs 的选择性吸收有关。Xie 等^[29]的亚慢性毒性实验中,用新鲜有毒的微囊藻细胞(MC-LR 和 MC-RR 的含量分别为 110 ~ 292 和 269 ~ 580 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\text{DW}$) 饲养鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*) 30 d,结果发现 MC-LR 在通过肠道时可能被有效消除并被抑制,而 MC-RR 则可以通过肠道进而分布到鱼体的各个部分。Dietrich 和 Hoeger 也指出一些很小的结构变化及 MCs 异构体的不同特性是造成这些毒素不同程度的被摄取、分布及排泄的原因^[6]。

3.2 MCs 肠毒性的病理学特征

肠道粘膜处于沟通机体内外环境的重要位置,具有消化、吸收、分泌和防御等重要功能,特别是在硬骨鱼类肠道内含有大量的白细胞,包括巨噬细胞、淋巴细胞、颗粒细胞、肥大细胞和浆细胞^[37]。Humpage 等^[38]在通过饮水口服给予 MCs 之前,先给予小鼠癌症诱发剂氧化偶氮甲烷(azoxymethane),其结肠畸变部位的大小呈现显著的剂量依赖性增加,说明小肠细胞将会受到不断循环进入小肠中的 MC-LR 的损害,并且 MC-LR 可能刺激肿瘤的生长。Ito 等^[7]研究进一步指出,小鼠口服 MC-LR 其最先在小肠被吸收,因 MC-LR 的存在,小肠表面肠上皮细胞微绒毛染色阳性,并且绒毛顶端受到严重损坏,MC-LR 也排泄到小肠和大肠的杯状细胞分泌的黏液中。在腹腔注射 75% LD_{50} 剂量的 MC-LR 对 Balb/c 大鼠肠道影响的研究中发现,MC-LR 引起的十二指肠、空肠、回肠细胞凋亡数的增加呈时间依赖性,最显著的增加见于十二指肠,其次是空肠和回肠,而免疫组化的结果表明肠病理损伤是由累积在肠微绒毛的 MC-LR 诱导^[8,15]。而鱼类经口暴露试验中^[16-17] MCs 主要导致肠上皮细胞空泡化、核固缩,微绒毛破坏甚至丢失。本研究中,MCs 诱导的肠道病理损伤与 MCs 含量变化趋势相反,呈时间-剂量依赖性的增长。在注射后 48 h 内,肠上皮细胞排列紊乱,结构破坏,淋巴细胞浸润和杯状细

胞数目显著增多,并且淋巴细胞随着时间的推移逐渐向绒毛表面移动,肠上皮绒毛膜甚至出现脱落和坏死,表明当 MCs 进入小肠后主要聚集在肠上皮微绒毛的表面,破坏微绒毛及绒毛顶端的细胞。类似的,在腹腔注射 MC-LR(50、100、150 mg/kg) 染毒的小鼠肝组织中也发现淋巴细胞浸润,表明 MC-LR 暴露导致了强烈的免疫反应^[39]。Ernst 等^[40]用 0.6 ~ 0.9 $\mu\text{g MC-L Req}\cdot\text{kg}^{-1}\text{bw}$ 剂量的浮丝藻(*Planktothrix Rubescens*) 对欧洲白鲑(*Coregonus lavaretus*) 进行灌胃暴露 72 h,结果发现肠绒毛膜结构破坏,肠上皮细胞溶解,脱落,白细胞出现。Djediat 等^[41]采用灌胃暴露的方式研究 MC-LR 在青鳉脾脏和肠组织的定位,结果显示 MC-LR 引起两个组织明显的巨噬细胞免疫反应。因此,本研究淋巴细胞浸润可能表明小肠粘膜层的免疫防御系统发挥作用,增加了免疫物的分泌和吞噬作用,用以减轻 MCs 的毒性作用。此外,注射后 7 d,本研究中低剂量组发现肠道病理损伤的恢复现象,表明单次染毒后肠道中累积 MCs 迅速清除或降解后,组织的损伤是可逆的。

综上所述,本研究结果表明:1) 两剂量组银鲫肠道 MC-RR 的累积呈时间依赖性降低,银鲫肠道中只能检测到 MC-RR,始终未能检测到 MC-LR,这可能与肠道上皮细胞对 MCs 的选择性吸收有关;2) 相对于毒素的累积,MCs 诱导的银鲫肠组织损伤具滞后性。注射后 48 h 内肠组织损伤随暴露时间的延长而加剧,且高剂量组较低剂量组损伤更严重,其显著特征包括:肠上皮细胞排列紊乱,甚至出现坏死、溶解和脱落,杯状细胞数目显著增多,微绒毛结构破坏并伴随淋巴细胞浸润;3) 肠道病理损伤在注射后 168 h 出现恢复现象,表明单次染毒后肠道中累积 MCs 迅速清除或降解后,组织的损伤是可逆的。

致谢:感谢华中农业大学水产学院李大鹏教授、张学振副教授和汤蓉老师在实验中提供的技术支持。

参考文献:

- [1] Chorus I, Bartram J. Toxic Cyanobacteria in Water - A Guide To Their Public Health Consequences, Monitoring and Management [M]. London: E&FN Spon, 1999: 416
- [2] 沈建国,章建. 微囊藻毒素的污染现状、毒性机理和检测方法[J]. 预防医学情报杂志, 2001, 17(1): 10-11, 16
- [3] 谢平. 微囊藻毒素对人类健康影响相关研究的回顾

- [J]. 湖泊科学, 2009, 21(5): 603-613
- Xie P. A review on the studies related to the effects of microcystins on human health [J]. Journal of Lake Sciences, 2009, 21(5): 603-613 (in Chinese)
- [4] Carmichael W W. The toxins of cyanobacteria [J]. Scientific American, 1994, 270(1): 78-86
- [5] Carmichael W W. The Cyanotoxins [M]. In: Callow J A (Ed.), Advances in Botanical Research, 27. London: Academic Press, 1997: 211-256
- [6] 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
- [7] Ito E, Kondo F, Harada K. First report on the distribution of orally administered microcystin-LR in mouse tissue using an immunostaining method [J]. Toxicon, 2000, 38(1): 37-48
- [8] Botha N, van de Venter M, Downing T G, et al. The effect of intraperitoneally administered microcystin-LR on the gastrointestinal tract of Balb/c mice [J]. Toxicon, 2004, 43(3): 251-254
- [9] Li L, Xie P, Lei H, et al. Renal accumulation and effects of intraperitoneal injection of extracted microcystins in omnivorous crucian carp (Carassius auratus) [J]. Toxicon, 2013, 49: 1150-1157
- [10] El Saadi O, Esterman A J, Cameron S, et al. Murray river water, raised cyanobacterial counts and gastrointestinal and dermatological symptoms [J]. Medical Journal of Australia, 1995, 162: 122-125
- [11] Pilotto L S, Douglas R M, Burch M D, et al. Health effects of recreational exposure to cyanobacteria (blue-green algae) during recreational water-related activities [J]. Australian and New Zealand Journal of Public Health, 1997, 21: 562-566
- [12] Kuiper-Goodman T, Falconer I R, Fitzgerald J. Human Health Aspects [M]. In: Chorus I, Bartram J (Eds.), Toxic Cyanobacteria in Water. London: E&FN Spon, 1999: 113-153
- [13] Teixeira M G L C, Costa M C N, Carvalho V L P, et al. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil [J]. Bulletin of the Pan American Health Organization, 1993, 27: 244-253
- [14] Falconer I R, Dornbusch M, Moran G, et al. Effect of the cyanobacterial (blue-green algal) toxins from Microcystis aeruginosa on isolated enterocytes from the chicken small intestine [J]. Toxicon, 1992, 30(7): 790-793
- [15] Botha N, Van de Venter M, Downing T G, et al. The role of microcystin-LR in the induction of apoptosis and oxidative stress in CaCo2 [J]. Toxicon, 2004, 43: 85-92
- [16] Atencio L, Moreno I, Jos A, et al. Dose dependent antioxidant responses and pathological changes in tenca (Tinca tinca) after acute oral exposure to microcystin under laboratory conditions [J]. Toxicon, 2008, 52: 1-12
- [17] Trinchet I, Djediat C, Huet H, et al. Pathological modifications following sub-chronic exposure of medaka fish (Oryzias latipes) to microcystin-LR [J]. Reproductive Toxicology, 2011, 32(3): 329-340
- [18] Falconer I R, Burch M D, Steffensen D A, et al. Toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) Microcystis aeruginosa in drinking water to growing pigs, as an animal model for human injury and risk assessment [J]. Environmental Toxicology and Water Quality, 1994, 9: 131-139
- [19] Falconer I R, Humpage A R. Tumor promotion by cyanobacterial toxins [J]. Phycologia, 1996, 35: 74-79
- [20] Magalhães V F, Marinho M M, Domingos P, et al. Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brazil, RJ) [J]. Toxicon, 2003, 42(3): 289-295
- [21] Xie L Q, Xie P, Guo L G, et al. Organ distribution and bioaccumulation of microcystins in freshwater fish at different trophic levels from the eutrophic lake Chaohu, China [J]. Environmental Toxicology, 2005, 20: 293-300
- [22] Zhao M, Xie S, Zhu X, 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: 2191-2199
- [23] 刘恩生, 刘正文, 鲍传和. 太湖鲫鱼数量变化的规律及与环境间关系的分析 [J]. 湖泊科学, 2007, 19(3): 345-350
- [24] Liu E S, Liu Z W, Bao C H. The changes of catches of Carassius auratus and relationship with environment in Lake Taihu, China [J]. Journal of Lake Sciences, 2007, 19(3): 345-350
- [25] Malbrouck C, Trausch G, Devos P, et al. Hepatic accumulation and effects of microcystin-LR on juvenile goldfish Carassius auratus L. [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, 2003, 135: 39-48
- [25] Li L, Xie P, Guo L. Antioxidant response in liver of the phytoplanktivorous bighead carp, Aristichthys nobilis intraperitoneally-injected with extracted microcystins [J].

- Fish Physiology and Biochemistry , 2010 , 36 (2) : 165 – 172
- [26] Harada K I , Suzuki M , Dahlem A M , et al. Improved method for purification of toxic peptides produced by cyanobacteria [J]. *Toxicon* , 1988 , 26 (5) : 433 – 439
- [27] Fawell J K , Mitchell R E , Everett D J , et al. The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: I microcystin-LR [J]. *Human & Experimental Toxicology* , 1999 , 18 : 162 – 167
- [28] Gupta N , Pant S C , Vijayaraghavan R , et al. Comparative toxicity evaluation of cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin variants (LR , RR , YR) in mice [J]. *Toxicology* , 2003 , 188 (2-3) : 285 – 296
- [29] Xie L Q , Xie P , Ozawa K , et al. Dynamics of microcystins-LR and -RR in the phytoplanktivorous silver carp in a sub-chronic toxicity experiment [J]. *Environmental Pollution* , 2004 , 127 (3) : 431 – 439
- [30] 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 : 137 – 141
- [31] Kagalou I , Papadimitriou T , Bacopoulos V , et al. Assessment of microcystins in lake water and the omnivorous fish (*Carassius gibelio* , Bloch) in Lake Pamvotis (Greece) containing dense cyanobacterial bloom [J]. *Environmental Monitoring and Assessment* , 2008 , 137 : 185 – 195
- [32] Cazenave J , Wunderlin D A , Bistoni M A , et al. Uptake , tissue distribution and accumulation of Microcystin-RR in *Corydoras paleatus* , *Jenynsia multidentata* , and *Odontesthes bonariensis* [J]. *Aquatic Toxicology* , 2005 , 75 : 178 – 190
- [33] Chen J , Xie P , Zhang D W , et al. In situ studies on the distribution patterns and dynamics of microcystins in a biomanipulation fish—bighead carp (*Aristichthys nobilis*) [J]. *Environmental Pollution* , 2007 , 147 : 150 – 157
- [34] Lei H H , Xie P , Chen J , et al. Distribution of toxins in various tissues of crucian carp intraperitoneally injected with hepatotoxic microcystins [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry* , 2008 , 27 (5) : 1167 – 1174
- [35] Williams D E , 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]. *Toxicon* , 1995 , 33 : 125 – 131
- [36] Li S X , Xie P , Xu J , et al. Tissue distribution of microcystins in bighead carp via intraperitoneal injection [J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* , 2007 , 79 (3) : 297 – 300
- [37] Press C M. The morphology of the immunesystem in teleost fishes [J]. *Fish and Shellfish Immunology* , 1999 , 9 : 309 – 318
- [38] Humpage A R , Hardy S J , Moore E J , et al. Microcystins (cyanobacterial toxins) in drinking water enhance the growth of aberrant crypt foci in the mouse colon [J]. *Journal of Toxicology and Environmental Health , Part A* , 2000 , 61 (3) : 155 – 65
- [39] Billam M , Mukhi S , Tang L , et al. 2008. Toxic response indicators of microcystin-LR in F344 rats following a single-dose treatment [J]. *Toxicon* , 2008 , 51 : 1068 – 1080
- [40] Ernst B , Hoeger S J , O'Brien E , et al. Oral toxicity of the microcystin-containing cyanobacterium *Planktothrix rubescens* in European whitefish (*Coregonus lavaretus*) [J]. *Aquatic Toxicology* , 2006 , 79 (1) : 31 – 40
- [41] Djediat C , Malécot M , de Luze A , et al. Localization of microcystin-LR in medaka fish tissues after cyanotoxin gavage [J]. *Toxicon* , 2010 , 55 : 531 – 535 ◆