DOI:10.15928/j.1674-3075.201905120118

微囊藻毒素急性暴露对斑马鱼卵巢的损伤效应

张同舟,张学振,刘婉婧,展春华

(华中农业大学水产学院 教育部长江经济带大宗水生生物产业绿色发展工程研究中心,湖北 武汉 430070)

摘要:为了探究蓝藻(*Cyanobacteria*)大量爆发产生的微囊藻毒素(microcystins,MCs)对鱼类的生殖毒性,以斑马鱼(*Danio rerio*)为实验对象,采取腹腔注射毒性最强的 microcystin-LR(MC-LR)方式,研究 MC-LR 对斑马鱼卵巢的损伤效应及其作用机制。对性成熟雌性斑马鱼腹腔注射 50 μg/kg 和 200 μg/kg MC-LR,在注射 3、9、24、48 h后取卵巢分析其生理活性指标的变化。结果显示,染毒 24 h 后,200 μg/kg 剂量组斑马鱼性腺指数(gonad somatic index,GSI)14.14 与对照组性腺指数 16.98 相比显著降低($P<0.05$),其他组别无显著变化;卵巢发生卵母细胞空泡化、卵母细胞膜与滤泡细胞层连接组织缺失等病理现象;MC-LR 显著抑制了斑马鱼卵巢蛋白磷酸酶(protein phosphatase 2A,PP2A)活性,并激活促成熟因子(maturation promoting factor,MPF)活性;MC-LR 处理后,斑马鱼卵巢内丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase,MAPK) 家族中的 *p*38MAPK、ERK1/2 的转录水平显著上调,JNK 未发生显著变化。研究表明,MC-LR 抑制斑马鱼卵巢 PP2A 活性,并激活 MPF 活性与 MAPK 信号通路中 ERK1/2 与 *p*38MAPK 的转录水平,进而干扰其卵母细胞的发育进程并产生生殖毒性。

关键词:微囊藻毒素;生殖毒性;腹腔注射;斑马鱼;蛋白激酶

中图分类号:X174 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-3075(2021)02-0116-08

蓝藻(*Cyanobacteria*)大量爆发会产生天然毒素,给水生生物造成严重危害,其中最常见的是微囊藻毒素(microcystins,MCs)(谢平,2009)。已发现的 100 多种 MCs 异构体中,微囊藻毒素 microcystin-LR(MC-LR)是毒性最强烈、研究最深入的一种(Gupta et al,2003;Puddick et al,2014)。在蓝藻水华爆发的水体中,鱼类直接处于 MCs 的暴露之下,会产生显著的生殖毒性。

大量研究表明,性腺是 MCs 除肝脏之外的第二靶器官,MCs 可在鱼类性腺中累积并导致各种病理损伤(Chen et al,2005;Papadimitriou et al,2010;Chen et al,2016);MCs 还可导致鱼类产卵量减少、受精率下降、幼鱼成活率降低并发育迟缓,且具有亲本传递效应(Liu et al,2014;Zhao et al,2015);此外,MCs 还会干扰鱼类性激素的分泌水平与性激素合成相关基因的表达(Su et al 2016;Cheng et al,2017;Lin et al,2018)。虽然上述研究论证了 MC-LR 对鱼类的生殖毒性作用,但关于其作用机制仍需进一步探究。

本研究采用腹腔注射 MC-LR 的方式对斑马鱼(*Danio rerio*)进行染毒,研究染毒后各个时间点斑马鱼性腺系数(gonad somatic index,GSI)变化与卵巢的病理损伤,探究卵巢内蛋白磷酸酶(protein phosphatase 2A,PP2A)、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase,MAPK)转录水平、卵母细胞促成熟因子(maturation-promoting factor,MPF)等指标的变化,从而探讨 MC-LR 对斑马鱼卵母细胞的发育进程可能存在的干扰作用,进一步论证微囊藻毒素对鱼类的生殖毒性及其致毒机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

用超纯水将 MC-LR 配成 1 mg/mL 的母液,-80℃保存备用。实验采用性成熟的 4 月龄 AB 野生型雌性斑马鱼,购自中国科学院水生生物研究所国家斑马鱼资源中心。正式实验前,实验鱼暂养 2 周以适应环境,饲养于(28±1)℃的曝气水中,给予充足的氧气,光暗比为 12 h∶12 h,在每日9∶00、14∶00、19∶00喂食。饲料为丰年虫幼虫活体,实验前 48 h 和染毒后不再喂食。

1.2 染毒与取样

挑选健康的性成熟斑马鱼 144 尾,随机分为 12 组(3 个实验组×4 个时间点),设置对照组、低剂

收稿日期:2019-05-12

基金项目:国家自然科学基金面上项目(编号:31670520)。

作者简介:张同舟,1995 年生,男,硕士研究生,研究方向为水生态毒理学。E-mail:tongzhou@webmail.hzau.edu.cn

通信作者:张学振。E-mail:xuezhen@mail.hzau.edu.cn

量和高剂量实验组。低、高剂量组按实验鱼体重注射剂量分别为 50 μg/kg、200 μg/kg，注射剂量约为 1/8LD_{50}和1/2LD_{50}（Hou et al，2014；侯杰，2017）。用 0.7%的生理盐水将微囊藻毒素 MC-LR 母液稀释成2.5 μg/mL和10 μg/mL的浓度，分别供低、高剂量组注射使用，每尾鱼按其体重注射 20 μL/g。注射前先对鱼进行称重，再计算得出注射体积，对照组的实验鱼注射相应体积的生理盐水。

染毒期间，随时观测鱼的状况，及时捞出死鱼，并做好记录。分别在染毒 3、9、24、48 h 后取样，每个时间点每组随机取鱼 12 尾。取样时先将鱼冰浴 10 s，再解剖取出卵巢并剔除结缔组织，将卵巢分成两部分，置于离心管后－80 ℃冻存。取样时对斑马鱼和卵巢进行称重并做好记录，性腺指数计算公式：GSI＝(性腺重×100)/全鱼重。

1.3　试剂与仪器

MC-LR 购自中国台湾 Algal 公司，PP2A 和 MPF 试剂盒购买自上海酶联生物科技有限公司，反转录试剂盒 PrimeScript 与 TB Green™ Advantage® qPCR Premix 购自 TaKaRa 公司。酶标仪、荧光定量 PCR 仪、高速冷冻离心机、显微镜等仪器均来自华中农业大学水产学院仪器共享平台。

1.4　组织切片制作

解剖分离取出完整卵巢后，将其浸泡于多聚甲醛。制作石蜡切片并利用苏木素与伊红对比染色法（H.E 对染法）染色。主要步骤包括固定、洗涤、脱水与透蜡、包埋、切片、贴片、脱蜡复水、染色、水洗、分化（分色）、漂洗、脱水、透明、封藏等。制作好切片后，放置在光学显微镜下观察、拍照。

1.5　酶活测定

每组取 6 个卵巢样品加入 PBS 缓冲液后匀浆，离心后得到上清液，再测定其 PP2A 和 MPF 活性。PP2A 与 MPF 活性均严格参照说明书测定。

1.6　基因表达

每组取 6 个卵巢样品，用 TRIpure 裂解液提取出总 RNA 后，在微孔板分光光度计上测定总 RNA 浓度与 A_{260}/A_{280}，利用反转录试剂盒将总 RNA 反转录为 cDNA，－20℃保存备用。Real Time PCR 反应体系 20 μL：10 μL TB Green，cDNA 0.2 μL，正、反引物各 0.8 μL，无 RNA 酶水 7.8 μL。反应条件：95℃预变性 5 min，95℃、10 s，56℃、20 s，72℃、20 s，共 40 个循环。实验所用的引物由 Primer premier 5.0 软件设计而得（表 1），最后采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法进行数据分析。

表 1　实时荧光定量 PCR 引物序列

Tab.1　Primer sequences for real-time PCR

基因	正向引物-F	反向引物-R
p38α	CCCGTGCAGTATCAGAACTT	CAGACTTGTGGCAGGTGTAA
p38β	CGGAGCGGTACCAGAATTTA	CGGGAGAGTTTCTTCACTGC
erk1	TTTGCGAAGGCGACGATTTG	GTATCGGGGGCCAACATCAA
erk2	TCCACTCCGCAAACGTTCTT	CATACTCCGTCAGGAAGCCG
jnk1	TACTGCTACGTCGTCTTGCC	GGACGTGCCATTTAATGAACC
18S rRNA	TCGCTAGTTGGCATCGTTTATG	CGGAGGTTCGAAGACGATCA

1.7　统计分析

文中实验数据均采用平均值±标准误（Mean±SE）表示。数据采用 SPSS 19.0 进行统计学分析，用 Levene′s 检验方差齐性，必要时对数据进行转换，再进行单因素方差分析（One-Way ANOVA），然后进行 Duncan′s 检验，以比较分析处理组和对照组（CK）的显著性。显著性水平设定为 $P<0.05$ 和 $P<0.01$，在图中分别用 * 和 * * 表示。图片在 GraphPad Software 6 软件中绘制而成。

2　结果与分析

2.1　斑马鱼行为观察与死亡率

注射 MC-LR 后，斑马鱼出现游泳速度加快、上下窜动等现象，以高剂量组更突出。24 h 后，高剂量组处还出现上下翻滚、打转等行为，并观测到鱼体表出血（图 1）。整个实验阶段，对照组和低剂量组

图 1　注射 MC-LR（200 μg/kg）24 h 后引起斑马鱼体表出血

Fig.1　Zebrafish surface bleeding at 24 h after injection of MC-LR (200 μg/kg)

未有鱼死亡，高剂量组在染毒24 h和48 h后的死亡率分别为8.3%和16.7%。

2.2　斑马鱼性腺指数变化

如图2所示，染毒24 h后，200 μg/kg剂量组斑马鱼GSI(14.14)与对照组(16.98)相比显著降低($P<0.05$)，其余无显著性变化。

2.3　卵巢组织病理变化

如图3所示，不同剂量的MC-LR注射至斑马鱼体内后，各个时间点斑马鱼卵巢组织出现病理损伤。在对照组卵巢中，各期卵母细胞清晰可见，成熟卵母细胞内部充满着卵黄颗粒(图3-A)；而注射MC-LR后，低、高剂量组斑马鱼卵巢在各个时间点均出现病理变化，主要有卵母细胞与周围的滤泡细胞层间连接组织缺失以及卵母细胞实质组织出现空泡化现象。

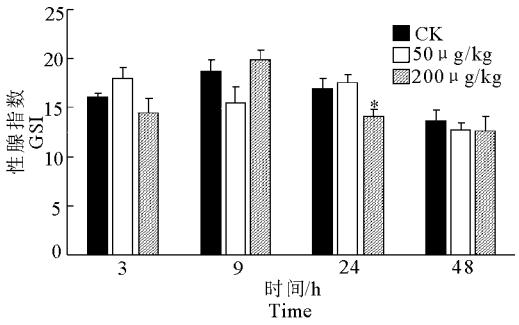
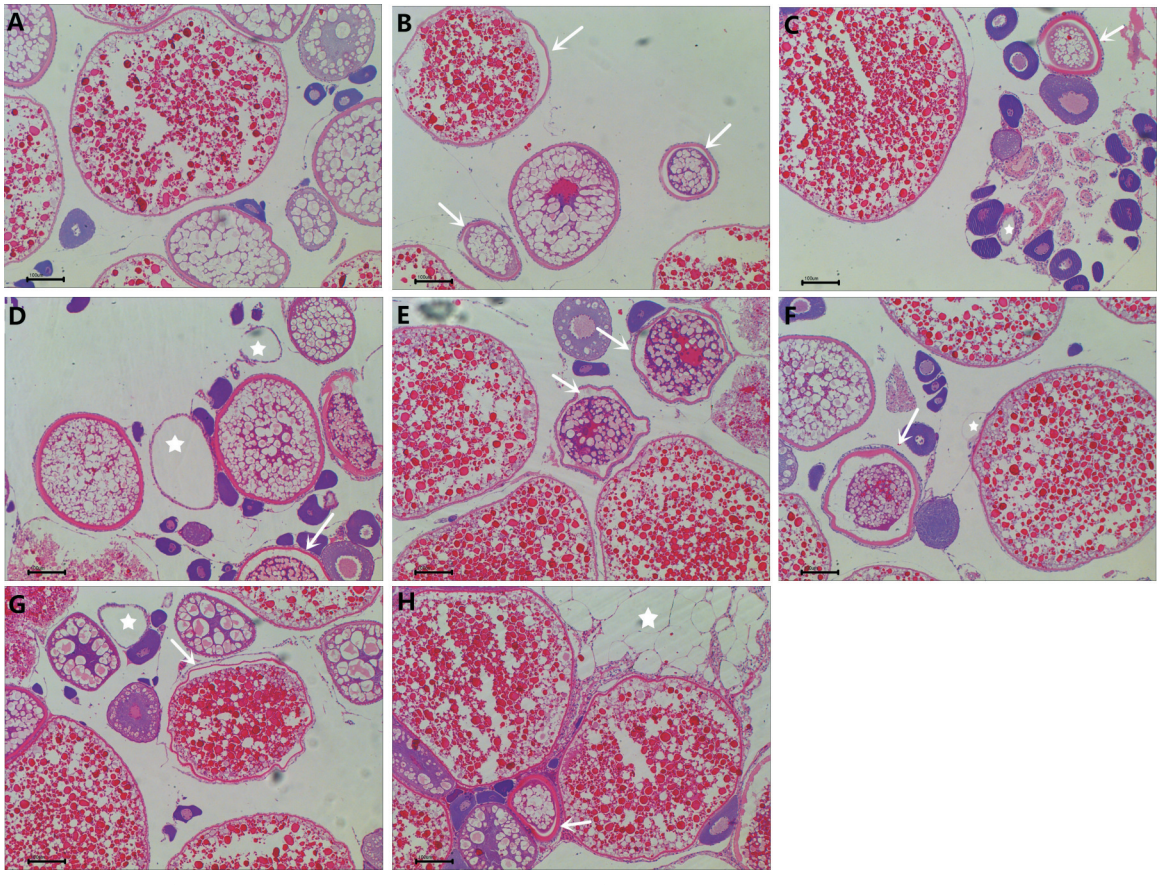


图2　腹腔注射MC-LR后斑马鱼性腺系数的变化

Fig.2　Changes in the gonadosomatic index (GSI) of zebrafish with different MC-LR treatments

2.4　卵巢内PP2A活性变化

如图4所示，在3 h时间点，50 μg/kg和200 μg/kg处理组PP2A活性均显著降低，其他时间点，高剂量组PP2A活性均显著降低($P<0.05$)。



A：对照组卵巢；B：注射3 h后的卵巢(50 μg/kg)；C：注射3 h后的卵巢(200 μg/kg)；D：注射9 h后的卵巢(50 μg/kg)；E：注射9 h后的卵巢(200 μg/kg)；F：注射24 h后的卵巢(50 μg/kg)；G：注射24 h后的卵巢(200 μg/kg)；H：注射48 h后的卵巢(200 μg/kg)。空泡化卵母细胞(☆)；卵母细胞与滤泡细胞层连接组织缺失(→)。标尺=100 μm

图3　腹腔注射不同浓度MC-LR后各时间点斑马鱼卵巢病理损伤

A: ovary of the control group; B: ovary 3 h after injection(50 μg/kg); C: ovary 3 h after injection (200 μg/kg); D: ovary 9 h after injection (50 μg/kg); E: ovary 9 h after injection (200 μg/kg); F: ovary 24 h after injection(50 μg/kg BW); G: ovary 24 h after injection (50 μg/kg); H: ovary 48 h after injection (200 μg/kg). Vacuolated oocyte (pentagram); Lack of connective tissue between oocyte and follicular cell layer. Bars represent 100 μm

Fig.3　Pathology of zebrafish ovaries at different time after intraperitoneal injection of MC-LR

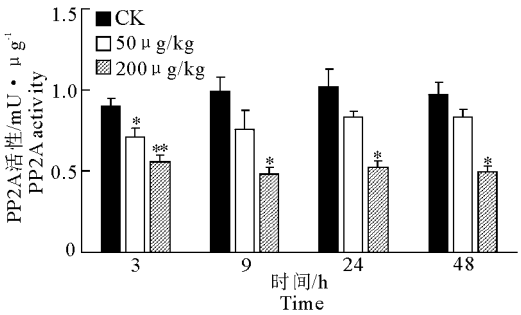


图 4　腹腔注射不同浓度 MC-LR 后斑马鱼卵巢 PP2A 活性的变化

Fig.4　Changes of PP2A activity in zebrafish ovaries after intraperitoneal injection of MC-LR

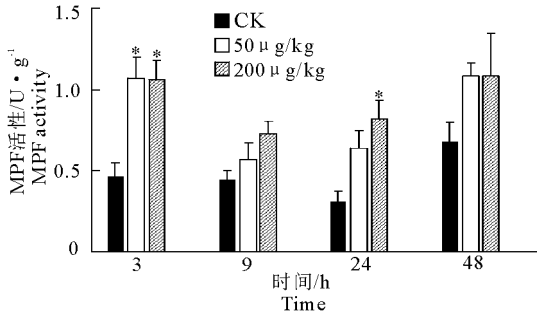


图 5　腹腔注射不同浓度 MC-LR 后斑马鱼卵巢 MPF 的活性变化

Fig.5　Changes of MPF activity in zebrafish ovaries after intraperitoneal injection of MC-LR

2.5　卵巢内 MPF 活性变化

如图 5 所示，腹腔注射 50 μg/kg、200 μg/kg MC-LR 后，2 个剂量组的斑马鱼卵巢内 MPF 活性在 3 h 时间点均显著升高，高剂量组在染毒 24 h 后显著升高（$P<0.05$）。

2.6　卵巢内 MAPK 相关基因表达

注射低剂量 MC-LR 可引起 *p38β* 和 *erk1* 转录水平的上调，但 *p38β*、*erk2* 和 *jnk1* 无变化；注射高剂量 MC-LR，*p38α*、*p38β*、*erk1*、*erk2* 的转录水平与对照组相比均有上调的趋势（$P<0.05$），*jnk1* 仍无明显变化（图 6）。

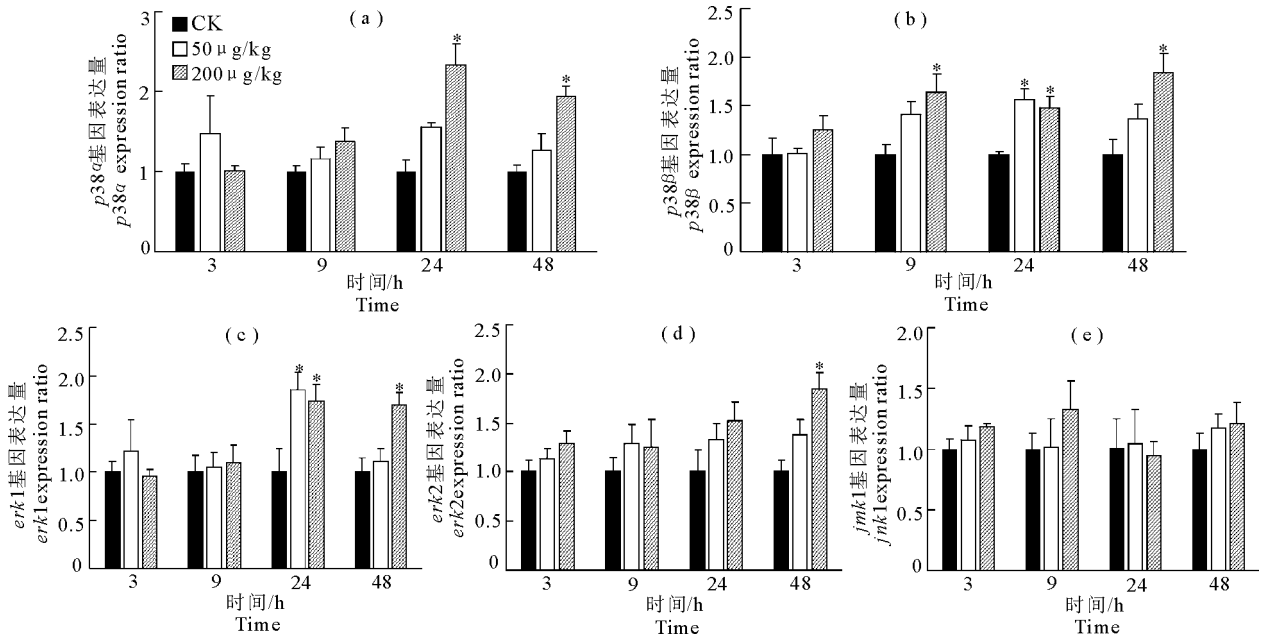


图 6　腹腔注射不同浓度 MC-LR 对斑马鱼卵巢 MAPK 家族基因表达量的变化

Fig.6　Changes in gene expression of the MAPK family in zebrafish ovaries after intraperitoneal injection of MC-LR

3　讨论

3.1　MC-LR 可导致鱼体脑组织病变和血液渗透

本研究中，斑马鱼存在游泳异常、体表出血等现象，是腹腔注射较高剂量 MC-LR 后产生毒性的显著表现，以往对斑马鱼和鲫（*Carassius auratus*）的研究也曾出现类似现象（Zhang et al，2007；Hou et al，2014）。斑马鱼游泳异常可能与 MC-LR 对其脑组织造成损伤、产生神经毒性有关。事实上，曾有学者在腹腔注射藻毒素粗提液后鲫的脑组织中检测到 MCs，并发现 MC-LR 可导致斑马鱼脑细胞发生病变，影响神经递质分泌（Lei et al，2008；Hou et al，2017；Wu et al，2017）；而鱼体表出血可能是由于腹腔注射 MC-LR 后导致其体内血液发生渗透（Zhang et al，2007）。

3.2　GSI 与 MC-LR 剂量效应及时间响应度有关

在研究毒素对斑马鱼、青鳉（*Oryzias latipes*）等模式鱼类的毒性时，GSI 是常用的生殖能力评价

指标(Tilton et al,2003;Hou et al,2016);有学者用MC-LR浸泡斑马鱼,发现斑马鱼GSI降低(Liu et al,2016;侯杰,2017)。本研究中,高剂量MC-LR注射雌性斑马鱼24 h后,其GSI显著降低。这表明GSI变化可能与MC-LR的剂量效应和时间响应度有关;另一方面也说明染毒后24 h可能是MC-LR对斑马鱼卵巢产生最大毒性作用的时间。

本研究发现,腹腔注射MC-LR后3～48 h,斑马鱼卵巢均出现卵母细胞空泡化、卵母细胞与滤泡细胞层脱离等损伤,高剂量组在48 h后卵母细胞空泡化现象尤为严重。本结果与Hou等(2014)的研究结论一致,用MC-LR亚慢性暴露斑马鱼也曾发现类似的病理现象(Qiao et al,2013;Liu et al,2016)。在MC-LR对青鳉的亚慢性暴露实验中,曾首次报道MC-LR导致卵母细胞膜与滤泡细胞连接损伤,这可能会影响卵母细胞与体细胞之间的物质交换,导致卵母细胞内卵黄存储减少(Tilton et al,2003;苏玉晶,2016)。因此,本研究认为,卵母细胞内卵黄存储减少及其实质组织发生空泡化,会进一步导致卵母细胞发育不良与鱼类GSI降低,最终对胚胎发育产生不利影响。

3.3 MC-LR对斑马鱼生理活性指标的影响

本研究中,各时间点斑马鱼卵巢PP2A活性受到显著抑制,与大量前期研究结果一致(Mackintosh et al,1990;Sun et al,2014),表明MC-LR可强烈抑制PP2A活性。低剂量组仅在3 h后受到抑制,高剂量在各个时间点均被抑制,可见MC-LR对PP2A抑制作用与暴露浓度和处理时间有关;郑群等(2011)也有过类似发现。PP2A能参与调节细胞周期、生长、凋亡和信号转导等生理过程,抑制PP2A是MC-LR最重要的致毒机制,会引起下游一系列的反应(Yang et al,2016)。

MPF是促进卵母细胞成熟的关键调节因子(韩树标等,2007;李国鹏,2011)。本研究中,MC-LR能显著提高MPF活性。有研究表明,PP2A是MPF有力的负调节因子,能灭活MPF的催化亚基$P34^{cdc2}$(Lee et al,1991;1994)。染毒3 h后,两个剂量组MPF活性升高,PP2A的活性显著降低,推测是MC-LR先抑制PP2A活性后、再激活MPF;而染毒9、24、48 h后,高剂量组PP2A活性一直被抑制,但仅24 h时高剂量组的MPF活性显著升高。事实上,MPF的活性受到多种上游因子的调控,比如蛋白激酶C(PKC)通路、MAPK通路、17α,20β-双羟孕酮等(Kondo et al,1997;陈大元,2000;韩树标等,2007;Zhang et al,2009;李国鹏,2011),因此导致MPF含量在卵母细胞成熟过程中呈规律性增减。可能正是这些原因,导致MC-LR处理后,不同时间点的MPF活性变化趋势不一致。

MAPK在真核细胞中广泛存在,包括细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated protein kinase,ERK)、*p*38MAPK、*c-Jun*氨基末端激酶(c-junamino-terminal kinase,JNK)(Junttila et al,2007;Sun et al,2015)3种亚型;其中,ERK1/2和*p*38MAPK已被广泛证明在动物配子的发育中发挥关键作用(Sobinoff et al,2013;Sun et al,2015;Wang et al,2015)。本研究中,腹腔注射MC-LR后,*p*38β、*p*38α、ERK1、ERK2被激活。有研究表明,MAPK受到蛋白磷酸酶PP2A调控,PP2A抑制剂能通过抑制PP2A而激活MAPK(Seshacharyulu et al,2013)。刘云等(2017)研究表明,用PP2A抑制剂冈田酸OA处理后人肝癌细胞,MAPK家族的转录水平、总蛋白表达量、磷酸化水平变化均显著升高;推测MAPK转录水平上调,可能是因为PP2A活性被抑制导致的,即MC-LR处理后,抑制PP2A活性,并激活MAPK通路。研究表明,在一些脊椎动物卵母细胞发育过程中,MAPK与MPF两者活性变化通常具有同步性,并可能存在互相激活的作用(Fan & Sun,2004;韩树标等,2007;李国鹏,2011;Tokumoto et al,2011;Lee et al,2016)。本研究中也可能存在类似的作用机制,如染毒24 h后高剂量组MPF活性再次被激活,可能与*p*38MAPK和ERK1/2转录水平的上调后存在某种联系。

MAPK在卵母细胞发育过程中具有启动第一次减数分裂恢复并促进卵母细胞发泡破裂(germinal vesicle breakdown,GVBD)的重要作用,卵母细胞GVBD率与MAPK活性呈正相关(Fan & Sun,2004;李国鹏,2011;Tokumoto et al,2011);而斑马鱼中GVBD的发生与MPF激活几乎又是同时发生的,在鲤(*Cyprinus carpio*)中也发现MAPK能激活MPF的催化亚基*cdc*2并诱导GVBD的发生(Paul et al,2009;李国鹏,2011)。基于MPF与MAPK在卵母细胞发育中的作用,推测MPF活性的提高与MAPK转录水平的升高,可能暗示着其卵母细胞第一次减数分裂的恢复和GVBD的提前。

4 小结

(1)腹腔注射MC-LR后,斑马鱼卵巢组织受到损伤,GSI降低。

(2)MC-LR 急性暴露后，斑马鱼卵巢 PP2A 活性明显抑制，激活了 MPF 活性与 MAPK 信号通路中 ERK1/2 与 p38MAPK 的转录水平。

(3)MPF 活性与 MAPK 家族转录水平的激活，可能会诱导斑马鱼卵母细胞发生 GVBD，表明 MC-LR 对卵母细胞减数分裂的进程具有干扰作用。

(4)后期应深入探究 MC-LR 可能存在的干扰卵母细胞发育的机制，如采用 MAPK 抑制剂与 MC-LR 联合暴露等方式，研究 MAPK 信号通路的转录水平与磷酸化水平的变化；或设置更多时间点，探究 MC-LR 毒性作用随时间的变化趋势。

参考文献

陈大元，2000. 受精生物学[M]. 北京：科学出版社：316－383.

韩树标，王爱萍，张力，等，2007. MPF 和 MAPK 在卵母细胞成熟过程中的作用[J]. 吉林畜牧兽医，(5)：14－16.

侯杰，2017. 微囊藻毒素－LR 对斑马鱼生殖和生长发育的影响及其机制[D]. 武汉：华中农业大学.

李国鹏，2011. MAPK 在斑马鱼卵母细胞第一次减数分裂恢复过程中的生理功能[D]. 上海：上海海洋大学.

刘云，李晓飞，邹倩倩，等，2017. 斑蝥素酸镁阻断 MAPK 信号通路抑制 SMMC－7721 人肝癌细胞增殖[J]. 细胞与分子免疫学杂志，33(3)：347－351.

苏玉晶，2016. 微囊藻毒素－LR 生殖内分泌干扰作用的体内和体外实验研究[D]. 武汉：华中农业大学.

谢平，2009. 微囊藻毒素对人类健康影响相关研究的回顾[J]. 湖泊科学，21(5)：603－613.

郑群，梁婧，徐立红，2011. 微囊藻毒素 LR 对人 HL7702 细胞蛋白磷酸酶 2A 的影响[J]. 水生生物学报，35(2)：313－318.

Chen J, Xie P, 2005. Tissue distributions and seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins-LR and-RR in two freshwater shrimps, *Palaemon modestus* and *Macrobrachium nipponensis*, from a large shallow, eutrophic lake of the subtropical China[J]. Toxicon, 45(5): 615－625.

Chen L, Chen J, Zhang X, et al, 2016. A Review of Reproductive Toxicity of Microcystins[J]. Journal of Hazardous Materials, 301: 381－399.

Cheng H, Yan W, Wu Q, et al, 2017. Parental exposure to microcystin-LR induced thyroid endocrine disruption in zebrafish offspring, a transgenerational toxicity[J]. Environmental Pollution, 230:981－988.

Fan H Y, Sun Q Y, 2004. Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals[J]. Biology of Reproduction, 70(3): 535－547.

Gupta N, Pant S C, Vijayaraghavan R, et al, 2003. Comparative toxicity evaluation of cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin variants (LR, RR, YR) in mice[J]. Toxicology, 188(2/3): 285－296.

Hou J, Li L, Xue T, et al, 2014. Damage and recovery of the ovary in female zebrafish i.p.-injected with MC-LR[J]. Aquatic Toxicology, 155: 110－118.

Hou J, Li L, Wu N, et al, 2016. Reproduction impairment and endocrine disruption in female zebrafish after long-term exposure to MC-LR: A life cycle assessment[J]. Environmental Pollution, 208: 477－485.

Hou J, Su Y J, Lin W, et al, 2017. Microcystin-LR retards gonadal maturation through disrupting the growth hormone/insulin-like growth factors system in zebrafish[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 139: 27－35.

Junttila M R, Li S P, Westermarck J, 2007. Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival[J]. The FASEB Journal, 22(4) : 954－965.

Kondo T, Yanagawa T, Yoshida N, et al, 1997. Introduction of Cyclin B Induces Activation of the Maturation-Promoting Factor and Breakdown of Germinal Vesicle in Growing Zebrafish Oocytes Unresponsive to the Maturation-Inducing Hormone[J]. Developmental Biology, 190(1): 142－152.

Lee H S, Kim K H, Kim E Y, et al, 2016. Obox4-silencing-activated STAT3 and MPF/MAPK signaling accelerate nuclear membrane breakdown in mouse oocytes[J]. Reproduction, 151(4): 369－378.

Lee T H, Solomon M J, Mumby M C, et al, 1991. INH, a negative regulator of MPF, is a form of protein phosphatase 2A[J]. Cell, 64(2): 415－423.

Lee T H, Turck C, Kirschner M W, 1994. Inhibition of cdc2 activation by INH/PP2A[J]. Molecular Biology of the Cell, 5(3): 323－338.

Lei H, Xie P, Chen J, et al, 2008. Distribution of toxins in various tissues of crucian carp intraperitoneally injected with hepatotoxic microcystins[J]. Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal, 27(5): 1167－1174.

Lin W, Guo H, Li Y, et al, 2018. Single and combined exposure of microcystin-LR and nitrite results in reproductive endocrine disruption via hypothalamic-pituitary-gonadal-liver axis[J]. Chemosphere, 211: 1137－1146.

Liu W, Qiao Q, Chen Y, et al, 2014. Microcystin-LR exposure to adult zebrafish (*Danio rerio*) leads to growth inhibition and immune dysfunction in F1 offspring, a

parental transmission effect of toxicity[J]. Aquatic Toxicology, 155: 360 - 367.

Liu W, Chen C, Chen L, et al, 2016. Sex-dependent effects of microcystin-LR on hypothalamic-pituitary-gonad axis and gametogenesis of adult zebrafish[J]. Scientific Reports, 6: 5464 - 5479.

Mackintosh C, Beattie KA, Klumpp S, et al, 1990. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants[J]. FEBS Letters, 264(2): 187 - 192.

Papadimitriou T, Kagalou I, Bacopoulos V, et al, 2010. Accumulation of microcystins in water and fish tissues: An estimation of risks associated with microcystins in most of the Greek Lakes[J]. Environmental Toxicology, 25(4): 418 - 427.

Paul S, Pramanick K, Kundu S, et al, 2009. Involvement of PI3 kinase and MAP kinase in IGF-I-and insulin-induced oocyte maturation in *Cyprinus carpio* [J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 309(1/2): 93 - 100.

Puddick J, Prinsep M R, Wood S A, et al, 2014. High Levels of Structural Diversity Observed in Microcystins from Microcystis CAWBG11 and Characterization of Six New Microcystin Congeners [J]. Marine Drugs, 12 (11): 5372 - 5395.

Qiao Q, Liu W, Wu K, et al, 2013. Female zebrafish (*Danio rerio*) are more vulnerable than males to microcystin-LR exposure, without exhibiting estrogenic effects [J]. Aquatic Toxicology, 142: 272 - 282.

Seshacharyulu P, Pandey P, Datta K, et al, 2013. Phosphatase: PP2A structural importance, regulation and its aberrant expression in cancer[J]. Cancer Letters, 335 (1): 9 - 18.

Sobinoff A P, Sutherland J M, Mclaughlin E A, 2013. Intracellular signalling during female gametogenesis[J]. Molecular Human Reproduction, 19(5): 265 - 278.

Su Y, Li L, Hou J, et al, 2016. Life-cycle exposure to microcystin-LR interferes with the reproductive endocrine system of male zebrafish[J]. Aquatic Toxicology, 175: 205 - 212.

Sun Y, Zheng Q, Sun Y T, et al, 2014. Microcystin-LR induces protein phosphatase 2A alteration in a human liver cell line[J]. Environmental Toxicology, 29(11): 1236 - 1244.

Sun Y, Liu W Z, Liu T, et al, 2015. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis[J]. Journal of Receptor and Signal Transduction Research, 35(6): 600 - 604.

Tilton S C, Foran C M, Benson W H, 2003. Effects of cadmium on the reproductive axis of Japanese medaka (*Oryzias latipes*)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 136 (3): 265 - 276.

Tokumoto T, Yamaguchi T, Ii S, et al, 2011. In Vivo Induction of Oocyte Maturation and Ovulation in Zebrafish[J]. 2PloS one, 6(9): e25206.

Wang F, Zhang L, Duan X, et al, 2015. RhoA-mediated FMNL1 regulates GM130 for actin assembly and phosphorylates MAPK for spindle formation in mouse oocyte meiosis[J]. Cell Cycle, 14(17): 2835 - 2843.

Wu Q, Yan W, Cheng H C, et al, 2017. Parental transfer of microcystin-LR induced transgenerational effects of developmental neurotoxicity in zebrafish offspring[J]. Environmental Pollution, 231: 471 - 478.

Yang D, Okamura H, Morimoto H, et al, 2016. Protein phosphatase 2A Cα regulates proliferation, migration, and metastasis of osteosarcoma cells[J]. Laboratory investigation, 96(10): 1050 - 1162.

Zhang X, Xie P, Li D, et al, 2007. Hematological and plasma biochemical responses of crucian carp (*Carassius auratus*) to intraperitoneal injection of extracted microcystins with the possible mechanisms of anemia [J]. Toxicon, 49(8): 1150 - 1157.

Zhang M, Ouyang H, Xia G, 2009. The signal pathway of gonadotrophins-induced mammalian oocyte meiotic resumption[J]. Molecular Human Reproduction, 15(7): 399 - 409.

Zhao Y, Xie L, Yan Y, 2015. Microcystin-LR impairs zebrafish reproduction by affecting oogenesis and endocrine system[J]. Chemosphere, 120: 115 - 122.

（责任编辑　万月华）

Ovary Damage in Zebrafish Resulting from Acute Exposure to MC-LR

ZHANG Tong-zhou, ZHANG Xue-zhen, LIU Wan-jing, ZHAN Chun-hua

(College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Engineering Research Center of Green development for Conventional Aquatic Biological Industry in the Yangtze River Economic Belt, Ministry of Education, Wuhan 430070, P.R.China)

Abstract: Cyanobacterial blooms caused by water eutrophication severely damage the aquatic environment. Microcystins (MCs) released by algae threatens the health of aquatic organisms and human health, and the most toxic MC is microcystin-LR (MC-LR). Studies have shown that, after the liver, gonads are the organ most susceptible to MC toxicity. The reproductive toxicity of MC-LR on egg production, fertilization rate, sex hormone levels and parental transmission have been demonstrated, but further research is needed on the toxic mechanism. In this study, the effect of MCs on zebrafish (*Danio rerio*) ovaries and the mechanism of toxicity were investigated by intraperitoneal injection of MC-LR into the abdominal cavity. Four-month-old sexually mature female zebrafish were selected for the test and three treatments were set: a control group and two treatment groups receiving MC-LR by intraperitoneal injection at 50 μg/kg and 200 μg/kg of body weight (BW). Ovaries for each treatment were sampled at 3, 9, 24 and 48 h after injection for analysis. The gonadosomatic index (GSI) of zebrafish in the 200 μg/kg treatment group decreased significantly at 24 h after MC-LR injection ($P < 0.05$), but no significant changes were found in the 50 μg/kg treatment group. However, pathology, such as vacuolization of oocytes and loss of connective tissue between the oocyte membrane and the follicular cell layer was observed in both treatment groups. MC-LR significantly inhibited ovarian protein phosphatase 2A (PP2A) activity and activated the maturation promoting factor (MPF). There was also a significant up-regulation in the transcription of the MAPK family of genes, but c-junamino-terminal kinase (JNK) activity did not change significantly. To summarize, acute exposure of zebrafish to MC-LR results in damage to ovarian tissue, a decrease in the GSI, decreased ovarian PP2A activity, activation of MPF and up-regulation of ERK1/2 and p38MAPK transcription. As a result of these multiple effects, we conclude that the reproductive toxicity of MC-LR in zebrafish results from interference with oocyte development.

Key words: microcystis; reproduction toxicity; intraperitoneal injection; zebrafish; protein kinase