

微囊藻毒素在鲤体内富集的初步研究

雷庆铎, 申 振, 赵艳霞

(华北水利水电学院 环境工程实验中心, 河南 郑州 450011)

摘要:为了解微囊藻毒素 MC-LR 在鲤各组织器官中的生物富集作用, 采用腹腔注射法将 MC-LR 纯品稀释液 ($0.215 \mu\text{g/g}$) 注射到鲤体内, 酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测 0、1、3、12、24 和 48 h 时肾脏、肝脏、肌肉、胆囊、空肠和卵巢中 MC-LR 含量分布和积累规律。结果显示, MC-LR 在肾脏含量最高, 均值为 $(1.007 \pm 0.120) \mu\text{g/g}$ (各器官均按干重计), 其次是肝脏 ($0.490 \pm 0.060 \mu\text{g/g}$ 、胆囊 ($0.355 \pm 0.011 \mu\text{g/g}$ 、空肠 ($0.210 \pm 0.005 \mu\text{g/g}$ 、卵巢 ($0.082 \pm 0.021 \mu\text{g/g}$ 和肌肉 ($0.047 \pm 0.003 \mu\text{g/g}$)。鲤不同组织器官对 MC-LR 的富集能力存在较大差异, 肾脏是 MC-LR 的主要靶器官, 卵巢中也存在少量 MC-LR 富集, 肌肉对 MC-LR 的生物富集量远低于其他组织器官。试验 48 h 时, 鲤体内各组织器官中和鱼缸水中 MC-LR 含量均有一定程度的下降, 表明鲤体内对 MC-LR 有较强的解毒机制。

关键词:鲤; 微囊藻毒素; 生物富集; 腹腔注射

中图分类号: X171.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-3075(2012)03-0133-05

近几年, 滇池、太湖、巢湖等湖泊每年都有不同程度的蓝藻水华爆发 (隋海霞等, 2004); 郑州市生活饮用水的 2 大主要水源地 (黄河花园口调蓄池和西流湖) 也呈不同程度的富营养化状态, 受到微囊藻毒素污染; 合肥、郑州、无锡等城市已发生因藻类大量生长导致自来水腥臭而停止供水的事件。在蓝藻产生的毒素中, 微囊藻毒素 (Microcystin, MC) 是分布最广、毒性最大的种类之一。微囊藻毒素是具有生物活性的七肽单环肝毒素, 性质稳定, 耐高温, 加热煮沸 (水浴 100°C , 30 min) 后不失活, 不挥发, 抗 pH 变化, 可溶于甲醇或丙酮 (Jones et al, 1994)。迄今为止已有 80 种以上 MC 被确认 (Luukkainen et al, 1994), 其中 MC-LR 是我国及世界范围内在天然水体中检出频率最多和含量最高的 MC 类型, 其不仅可能是肝癌的促进剂, 同时还可能是启动剂。

长期暴露于富营养化水域中的水生生物体内有 MC 的生物富集 (Kankânp et al, 2004; 陈隽, 2006; 杨静东等, 2009)。鲤属于底栖杂食性鱼类, 若长期暴露于 MC-LR 污染水域或者摄入受 MC-LR 污染的水生生物, 体内会存在 MC-LR 的积累, 若被人类长期食用, 可能会产生急性或慢性的毒性效应, 直接危害到人类健康。

目前, 研究微囊藻毒素在鱼体内的染毒试验主要采用灌喂、腹腔注射和将鱼暴露在含有 MC 粗藻粉的水中饲养等方法, 试验鱼为虹鳟、罗非鱼、鲫、鳊、草鱼、鲢、金鱼和斑马鱼等。仅有少数文献对 MC 在鲤组织器官中的分布进行探讨, 尚未见在腹腔注射条件下, 研究 MC-LR 在鲤各组织器官中富集的报道。

本文通过研究腹腔注射条件下, MC-LR 在鲤肾脏、肝脏、背部肌肉、胆囊、空肠和卵巢的富集分布和积累趋势, 为制定水产品中 MC-LR 的标准限值和研究杂食性鱼类对 MC-LR 的解毒机理提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 微囊藻毒素标准品

标准品 MC-LR (分子式 $\text{C}_{49}\text{H}_{74}\text{N}_{10}\text{O}_{12}$, 相对分子质量 995.12; 纯度 98%) 和 Beacon 试剂盒购于北京安易世纪贸易有限公司。

1.2 试验鱼种及饲养环境

试验用鲤购买于郑州花卉市场, 选择鱼鳍完整舒展、行动活泼、体色光泽、食欲好、逆水性强的 30 尾鱼 (雌雄比为 1:1) 进行试验, 平均体长 $(10.67 \pm 0.70) \text{cm}$, 平均体重 $(43.72 \pm 6.00) \text{g}$ 。

试验容器采用 2 个 800 L 的玻璃缸, 缸内盛水量以每尾鱼约 2~3 L 水为宜, 虹吸 1/3 原水和至少放置 3 d 以上的去氯自来水作为养殖用水。鲤分对照组 10 尾和试验组 20 尾, 并分开驯养, 1 周后进行试验。试验水温 27°C , pH 7.06~7.37, 试验期间持

收稿日期: 2011-12-06

基金项目: 河南省重点科技攻关计划 (092102110077)。

作者简介: 雷庆铎, 1962 年生, 高级实验师, 硕士生导师, 主要从事污染水域生物修复及微污染物检测。E-mail: leiqingduo@ncwu.edu.cn

续充氧,不清理粪便,不投食(考虑到 MC-LR 的肝毒性与摄食状态有关)。

1.3 测定 MC-LR

将 MC-LR 按 0.215 $\mu\text{g/g}$ 腹腔注射到鲤体内,1、3、12、24 和 48 h 进行采样;对照组注射等量超纯水,仅在 0 h 和 48 h 进行采样。每次每组随机取活鱼 3 尾(至少 1 尾雌鱼),称体重,量体长,用粗滤纸吸干表面水分,迅速解剖鱼体,把肾脏、肝脏、背部肌肉、胆囊、空肠和卵巢组织分离出来并称重。各组织分别混合均匀后人工研磨,将所有样品冷冻干燥。干燥后碾磨成粉末状,分别称取 0.2 g 置于 20 mL 的洁净硬质玻璃样品瓶中,加入 5 mL 的 100% 甲醇完全覆盖样品,浸泡 2 d。

依照 Magalhaes 等(2003)的方法并进行适当调整,将浸泡样品在磁力器上搅拌 2 h,超声波粉碎仪器破碎 1 min,离心(4 200 r/min,30 min),取上清液,残渣再用 5 mL 100% 甲醇重复提取 2 次,离心 10 min,合并上清液。上清液用 10 mL 正己烷萃取 3 次,旋转蒸发至近干(水浴锅温度为 35 ~ 50 $^{\circ}\text{C}$)。将浓缩液稀释至约 20%,过已活化的 C18 固相萃取小柱,淋洗,吹干。最后用 10 mL 含 0.1 % TFA(三氟乙酸)的甲醇洗脱,洗脱液旋转蒸发浓缩至干。用

1 mL超纯水溶解后储存在 eppendorf 管中,−20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻保存待测。

试验组和对照组鱼缸在鱼体注射 MC-LR 后 0、1、3、6、12、24、36 和 48 h 采样。将水样 −20 $^{\circ}\text{C}$ /37 $^{\circ}\text{C}$ 反复冻融 3 次,经孔径 0.45 μm 滤膜过滤,−20 $^{\circ}\text{C}$ 保存在 1.0 mL 的 eppendorf 管中待检。

所有样品都利用酶联免疫检测仪做吸附试验(ELISA)进行检测分析,结果表示成每 1 g 干重的 MC-LR 的当量值。

1.4 数据分析

利用 Excel 软件对试验数据进行双因素无重复方差分析,利用 SPSS 软件对各组织 MC-LR 含量的相关性进行分析。

2 结果与分析

2.1 鲤各组织器官中 MC-LR 含量分布

鲤各组织中 MC-LR 含量分布见图 1。不同组织器官的积累水平有明显的差异,表现为:肾脏>肝脏>胆囊>空肠>肌肉。MC-LR 含量在肾脏和肝脏中积累较高。肾脏中 MC-LR 平均含量为 1.007 $\mu\text{g/g}$ (以干重计),注射 1 h 后 MC-LR 含量迅速上升,3 h 时略微下降,之后又逐渐上升,并在

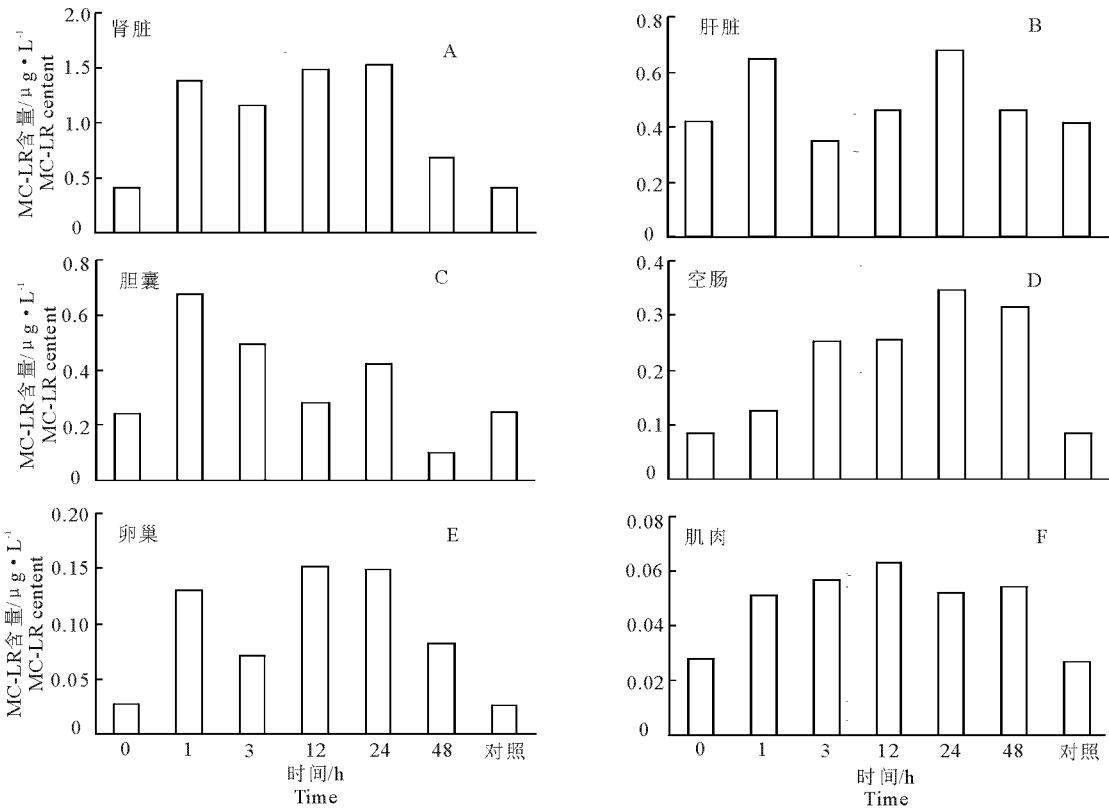


图 1 MC-LR 在鲤体内各组织器官中的分布

Fig. 1 Distribution of MC-LR in the different *Cyprinus carpio* organs

24 h时达到峰值1.525 μg/g,48 h后毒素含量下降(图1A)。肝脏中 MC-LR 平均含量为 0.490 μg/g(以干重计),富集趋势基本与肝脏相同,24 h 时达到高峰 0.676 μg/g(图1B)。胆囊中 MC-LR 平均含量为0.355 μg/g(以干重计),在注射 1 h 后,毒素富集迅速达到最高峰 0.674 μg/g,12 h 时降低,24 h 又小幅升高,48 h 后下降(图1C)。空肠中 MC-LR 含量均值为0.210 μg/g(以干重计),肠道中毒素含量富集较滞后,在 24 h 达到峰值 0.346 μg/g(图1D)。鲤卵巢中存在少量富集,富集量略高于肌肉,其均值为 0.082 μg/g(以干重计),峰值出现在 12 h,为0.152 μg/g(图1E)。各时间鲤肌肉对 MC-LR 的生物富集量远低于其他组织,含量平缓增加后又逐渐减少,其含量均值为0.047 μg/g(以干重计),在12 h时达到最高值0.063 μg/g(图1F)。

2.2 鱼缸水中 MC-LR 含量变化

注射 MC-LR 后 48 h 内鱼缸水样中 MC-LR 的浓度随时间变化见图 2。试验组鱼缸水样 MC-LR 含

量逐渐上升,24 h时出现高峰值,为0.531 μg/L,之后含量逐渐下降,48 h 时下降到0.406 μg/L,但是仍然高于空白对照组 48 h 的 MC-LR 含量 0.126 μg/L。

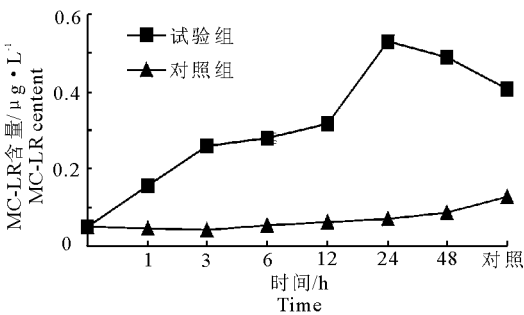


图 2 鱼缸水中 MC-LR 含量变化
Fig. 2 The concentration variation of MC-LR in the aquaria water

2.3 MC-LR 检测结果分析

以组织类型和时间为 2 个独立因素,对所测得的数据进行双因素无重复方差分析,其结果见表 1。

表 1 双因素无重复方差分析结果

Tab. 1 Results from two-way analysis of variance

差异源	离差平方和 SS	自由度 df	均方 MS	F 检验	P 值	收敛容差 F _{crit}
时间	0.2297	4	0.05742	2.0722	0.1226	2.8661
组织类型	4.7281	5	0.94561	34.1246	3.95 × 10 ⁻⁹	2.7109
误差	0.5542	20	0.02771			
总计	5.5120	29				

由以上分析可知,组织类型的 P 值小于 0.01,其对分析结果有极显著影响;时间的 P 值大于 0.05,其对分析结果无显著影响。

各组织 MC-LR 含量的相关性分析结果见表 2。

表 2 各组织 MC-LR 含量的相关性分析

Tab.2 Correlation analysis of MC-LR contents among different organs

组织	肝脏	胆囊	卵巢	肌肉	空肠	肾脏
肝脏	1					
胆囊	0.138	1				
卵巢	0.725	0.251	1			
肌肉	0.173	0.310	0.732 *	1		
空肠	0.612	0.229	0.781 *	0.796 *	1	
肾脏	0.563	0.644	0.895 **	0.779 *	0.730 *	1

注: * 表示显著相关(P<0.05), ** 表示相显著相关。

Notes: * indicated significant correlation, ** indicated an extremely signification correlation.

肾脏和卵巢之间存在极显著的正相关(pearson 积距相关系数 r = 0.895, P < 0.01),说明肾脏中毒素含量值较高时,卵巢中值也较高;卵巢与肌肉、空肠,肌肉与肾脏、空肠,肾脏与空肠都存在显著的正

相关性(P < 0.05);其他组织之间可以认为相关性较弱或不相关。

3 讨论

3.1 鲤各组织对 MC-LR 的富集差异

鲤的肾脏和肝脏是 MC-LR 的主要靶器官,含量均值占检测组织器官总含量的 68.35 %。陈家长等(2010)采用腹腔注射 MC-LR 的急性中毒方法,发现罗非鱼肝脏中毒素含量均值最高,其变化区间为 0.902 ~ 4.938 mg/kg。李嗣新(2007)将粗微囊藻毒素干粉(主要为 MC-LR、MC-RR 和 MC-YR)注射到鳊鱼腹腔内,认为肠道中 MC-LR 含量在注射 1 h 后达到最高,之后迅速下降,而胆囊中毒素含量峰值出现时间较滞后,在 12 h 达到高峰。这与本试验中的富集速率及变化趋势有一定差异,推测其原因有二:一是鱼种类不同导致的器官特异性差异;二是 MC 粗提液同 MC-LR 纯品的毒性之间存在差异,可能是粗提液中一些尚未明确的成分与 MC 相互作用,改变了毒素的吸收速率(Best et al, 2002; Falconer,

2007)。不同时间肌肉对 MC-LR 的生物富集量远低于其他组织,含量平缓增加后又逐渐减少,这与其他文献报道一致(Ding et al,1998;吴幸强等,2010)。此外,鲤性腺中也有一定的 MC-LR 富集,是否会影响鲤的繁殖还有待进一步研究。

部分对照组 0 h 时各器官中微囊藻毒素的含量并不低,其值有时可达试验组最高值的一半,其原因可能是试验鱼此前有过暴露微囊藻毒素的历史,由于试验设计不清理粪便,鱼缸水体可能会受到藻毒素的污染,鱼体在驯养 1 周的过程中会产生微囊藻毒素的二次富集,同时由于受到藻毒素的污染,部分鱼的生理机能降低,也会使对照组的藻毒素含量测定值偏大。由于对照组鱼体内藻毒素含量的检测值是作为试验的本底值存在,所以其值的高低不会对试验数据的准确性及变化趋势产生大的影响。

3.2 鲤对 MC-LR 的解毒机制

鲤组织器官与鱼缸水中的 MC-LR 含量在 48 h 后都有一定程度的下降,表明鲤体内可能存在某种降解 MC-LR 的机制。Li 等(2005)通过向鳙腹腔内注射 MC 粗毒素,用 HPLC 检测认为鳙体内可能存在某种活跃基降解或者结合 MC-LR 的机制。通过试验现象及前人的研究成果可以得出,鲤体内也存在很好的解毒机制,MC-LR 可能在通过肠道时被消除和抑制,或是鱼体对藻毒素产生适应性并与其共存。研究 MC-LR 在杂食性鱼类中的解毒机理有较强的实际意义,需要进一步的试验研究。

参考文献

陈家长,张美娜,胡庚东,等. 2010. 微囊藻毒素-LR 在罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 体内的动态分布[J]. 生态学杂志, 29(9): 1777-1781.

陈隽. 2006. 肝毒性微囊藻毒素在巢湖和太湖水生动物体内的生物富集及对水产品安全性的潜在威胁[D]. 武汉:中国科学院水生生物研究所.

李嗣新. 2007. 微囊藻毒素的生态学和毒理学研究[D]. 武汉:中国科学院水生生物研究所.

隋海霞,陈艳,严卫星,等. 2004. 淡水湖泊中微囊藻毒素的污染[J]. 中国食品卫生杂志, 16: 112-114.

吴幸强,龚艳,王智,等. 2010. 微囊藻毒素在滇池鱼体内的

积累水平及分布特征[J]. 水生生物学报, 31(3): 214-216.

杨静东,胡梁斌,周威,等. 2009. 微囊藻毒素在鲢鱼体内生物富集及其体内的抗氧化反应[J]. 生态环境学报, 18(6): 2044-2050.

Best J H, Pflugmacher S, Wiegand C. 2002. Effects of enteric bacterial and cyanobacterial lipopolysaccharides, and of microcystin-LR, on glutathione-S-transferase activities in zebra fish (*Danio rerio*) [J]. Aquat., Toxicol., 60:223-231.

Ding W X, Shen H M, Shen Y, et al. 1998. Microcystic Cyanobacteria cause mitochondria membrane potential alterations and reactive oxygen species formation in primary cultured rat hepatocytes [J]. Environmental Health Perspectives, 106(7): 409-413.

Falconer I R. 2007. Cyanobacterial toxins present in *Microcystis aeruginosa* extracts-more than microcystins [J]. Toxicon, 50: 585-588.

Jones G J, Orr P T. 1994. Release and degradation of microcystins following algaecide treatment of a microcystins *aeruginosa* bloom in a recreational lake, as determined by HPLC and protein phosphatase inhibition assay [J]. Water Research, 28(4): 871-876.

Kankkäänp H T, Holliday J, Schroöder H, et al. 2004. Cyanobacteria and prawn farming in northern New South Wales, Australia-a case study on cyanobacteria diversity and hepatotoxin bioaccumulation[J]. Toxicol App Pharm, 203: 243-256.

Li L, Xie P, Chen J. 2005. 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, 46: 533-545.

Luukkainen R, Namikoshi M, Sivonen K, et al. 1994. Isolation and identification of microcystins from strains and two bloom samples of *Microcystis* spp.: structure of a new hepatotoxin [J]. Toxicon, 32: 133-139.

Magalhaes V F, Marinho M M, Domingos P, et al. 2003. Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil RJ) [J]. Toxicon, 42(3): 289-295.

(责任编辑 杨春艳)

Primary Study on Bioaccumulation of Microcystin-LR in *Cyprinus carpio*

LEI Qing-duo, SHEN Zhen, ZHAO Yan-xia

(The Environmental Engineering Experiment Center of North China university of water resources and electric power, Zhengzhou 450011, P. R. China)

Abstract: To study the bioaccumulation of microcystin-LR (MC-LR) in different organs in *Cyprinus carpio*, MC-LR contents were measured by the means of ELISA at 1, 3, 12, 24 and 48 h after fish being injected with a dose of 0.215 μg/g body weight MC-LR using intraperitoneal injection. The results showed that MC-LR mean content in kidney was (1.007 ± 0.120) μg/g (dry weight), followed by liver (0.490 ± 0.060) μg/g, gallbladder (0.355 ± 0.011) μg/g, intestine (0.210 ± 0.005) μg/g, ovarian (0.082 ± 0.021) μg/g and muscle (0.047 ± 0.003) μg/g. The bioaccumulation of MC-LR has large differences in *C. carpio* different organs, with the kidney being the main target organs, while the concentration of microcystin-LR in the muscle and ovarian was relatively low. At 48 h, microcystin-LR content in the analyzed tissues/organs and aquaria water was significantly decreased, which indicated that *C. carpio* body has a strong detoxifying mechanism for degrading MC-LR.

Key words: *Cyprinus carpio*; MC-LR; bioaccumulation; intraperitoneal injection