

# 鲤肝细胞抗氧化系统对微囊藻毒素毒性的反应

李效宇<sup>1</sup> 刘永定<sup>2</sup> 宋立荣<sup>2</sup> 乔志刚<sup>1</sup>

(1. 河南师范大学生命科学院, 新乡 453002; 2 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

**摘要:** 用  $10\mu\text{g}/\text{L}$  的微囊藻毒素 LR(Microcystin LR, MG-LR) 处理鲤肝细胞培养物, 检测鲤肝细胞抗氧化系统的 6 项指标。结果表明, MG-LR 处理后活性氧(ROS) 含量明显升高, 还原型谷胱甘肽(GSH) 含量迅速下降, 超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT) 的活性明显升高, 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px) 活性在 MG-LR 处理 15min 后也有明显上升, 但谷胱甘肽 S 转移酶(GST) 活性在 MG-LR 处理后没有明显变化。另外, 还从氧自由基理论解释了微囊藻毒素造成鲤肝细胞损伤的可能机理。

**关键词:** 微囊藻毒素; 鲤鱼; 肝细胞; 抗氧化系统; 毒性

中图分类号: X174 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2003)05-0472-004

微囊藻毒素(Microcystins, MC) 是一类具生物活性的单环七肽<sup>[1]</sup>, 主要由淡水藻类铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*) 产生<sup>[2]</sup>。含有微囊藻毒素的水华能引起野生动物、鱼类、家畜、家禽及宠物中毒和死亡, 中毒死亡主要是由于肝损伤, 微囊藻毒素造成肝内出血甚至肝坏死<sup>[3, 4]</sup>。微囊藻毒素同样也危害人类健康, 如果经常暴露于含有毒素的水体, 会引发人患肝炎及肝癌<sup>[5, 6]</sup>。有研究证明, 饮用含有微囊藻毒素水的人群肝癌发病率明显高于饮用深井水者<sup>[7]</sup>。由于微囊藻毒素专一性地作用于肝脏, 是极强的促肿瘤剂, 对人类健康的危害正日益受到全世界关注。目前, 联合国已推荐了饮用水微囊藻毒素限量标准, 最高允许含量为  $1\mu\text{g}/\text{L}$ <sup>[8]</sup>。

关于 MC 对细胞的氧化损害及细胞抗氧化系统对 MC 毒性的反应研究一直为许多研究者关注, 但以往的工作多集中在 MC 对肝细胞的还原型谷胱甘肽(Glutathione, GSH) 的作用方面<sup>[9]</sup>, 而对细胞抗氧化系统中的其他成分, 如超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)、谷胱甘肽 S 转移酶(Glutathione S-transferase, GST)、谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione Peroxides, GSH-Px) 等的作用鲜见报道; 而且动物细胞经 MC 处理后, 其活性氧(Reactive oxygen species, ROS) 的变化情况尚未见相关的研究报道。用 MC-LR 处理鲤肝细胞, 分期测定 ROS、GSH、SOD、CAT、GST 和 GSH-Px 的含量

及活性变化, 研究鲤肝细胞抗氧化系统对 MC-LR 毒性的反应, 揭示 MC-LR 对鲤肝细胞损害的机制。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 微囊藻毒素(MG-LR) 由中国科学院水生生物研究所藻类研究室制备、纯化, 含量为 85%。先将毒素溶于少量甲醇中, 制成贮液,  $-20^{\circ}\text{C}$  下保存备用, 临用前用灭菌的磷酸缓冲液(pH7.2) 稀释成所需浓度, 其中母液(即经第一次稀释) 的 MG-LR 含量经 HPLC 测定为  $0.25\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。用于制备肝细胞的鲤(*Cyprinus carpio*) 由中国科学院水生生物研究所关桥养殖基地提供, 2 龄成鱼, 体重 1kg。

**1.2 鲤肝细胞培养** 实验鱼暂养 3d 后, 剪断鳃部脉弓, 放血 30—40min; 清洗、消毒鱼体表面后, 在超净工作台内解剖取肝脏; D-Hanks 液清洗, 然后剪成  $1-2\text{mm}^3$  的小块; D-Hanks 液再清洗 2 次, 用 2 倍(V/V) 的 0.25% 胰蛋白酶液消化 50min, 温度  $25-28^{\circ}\text{C}$ 。100 目滤网过滤以除去碎块, 500—800r/min 离心 5min, 取肝细胞。Hanks 液清洗 2 次后, DMEM 培养基悬浮, 计数细胞密度, 使其达到  $0.5 \times 10^6\text{ cells}/\text{mL}$ 。肝细胞在多孔培养板或培养瓶中培养, 培养基采用 DMEM 或 199, 补加 10% 的胎牛血清、100IU 青霉素和  $100\mu\text{g}/\text{mL}$  四环素。温度  $25^{\circ}\text{C}$ , 密闭培养, 不补充  $\text{CO}_2$ 。

**1.3 MC-LR 处理** 将刚获取的鲤肝细胞用  $10\mu\text{g}/\text{L}$

收稿日期: 2002-10-27; 修订日期: 2002-11-25

基金项目: 国家科技部重点项目“滇池蓝藻水华污染控制的技术研究”(K99-05-35-01); 河南省教育厅青年骨干教师项目资助

作者简介: 李效宇(1965—), 男, 河南省新蔡县人; 博士、教授; 主要从事藻类学和分子毒理学研究

MC-LR 缓冲液直接暴露处理, 密封后按以上细胞培养方法培养。毒素处理后, 每隔 0.5—1h 取肝细胞培养物, 500—800r/min 离心 5min, 取肝细胞: 4℃下研磨、匀浆肝细胞, 4000r/min 离心, 取上清, -20℃保存备用。

**1.4 鲤肝细胞培养物的测定** ROS、GSH 含量及 SOD、CAT、GSH、GSH-Px 酶活性均采用南京建成生物工程研究所的试剂盒测定。

## 2 结果

### 2.1 MG LR 处理对鲤肝细胞 ROS 含量的影响

MG-LR 处理培养的鲤肝细胞后, ROS 含量发生明显变化(图 1)。MG-LR 处理 6h 后, 肝细胞培养物的 ROS 含量升高 3 倍, 而对照只有略微上升。说明 MG-LR 刺激了鲤肝细胞 ROS 的释放, 使肝细胞处于氧化应激状态, 这也说明 MG-LR 的毒性在一个方面表现为氧化损伤。

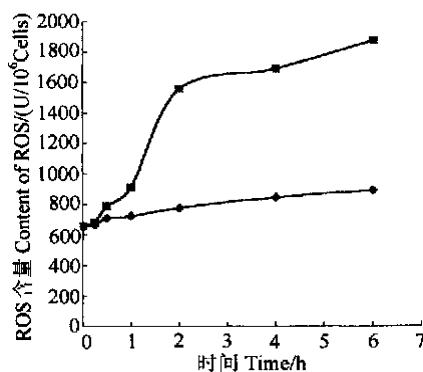


图 1 MG LR 对鲤肝细胞 ROS 含量的影响

Fig. 1 Effect of MG LR on the contents of ROS in the hepatocytes of *C. carpio*

■处理, ◆对照

### 2.2 GHS 含量变化

MG-LR 处理 6h 后, 培养的肝细胞 GSH 含量明显下降(图 2), 几乎达 3 倍之多, 而对照 GSH 只有略微下降, 表明 GSH 参与了对 MG-LR 所造成的氧化损害的防御(解毒)。

### 2.3 MG LR 处理后, 肝细胞培养物 SOD 活性的变化

鲤肝细胞培养物 SOD 活性随 MG-LR 处理的时间延长而逐渐升高(图 3), 对照 SOD 活性只有略微升高, 处理和对照 SOD 活性变化有明显差异。

### 2.4 CAT 活性变化

MG-LR 处理后, 培养的鲤肝细胞 CAT 活性升高 2 倍多(图 4)而对照 CAT 活性只有略微升高, 处理和对照差异明显。

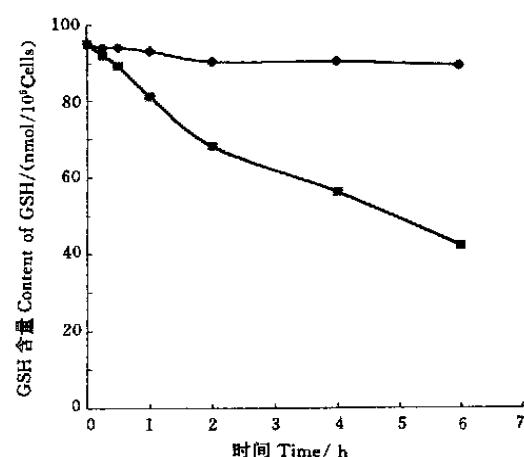


图 2 MG LR 对鲤肝细胞 GSH 含量的影响

Fig. 2 Effect of MG LR on the contents of GSH in the hepatocytes of *C. carpio*

■处理, ◆对照

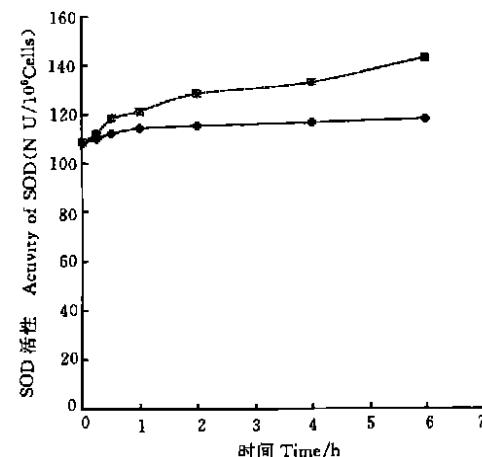


图 3 MG-LR 对鲤肝细胞 SOD 活性的影响

Fig. 3 Effect of MG LR on the activities of SOD in the hepatocytes of *C. carpio*

■处理, ◆对照

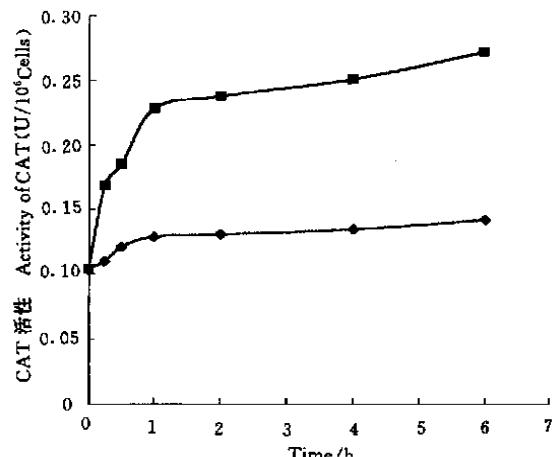


图 4 MG-LR 对鲤肝细胞 CAT 活性的影响

Fig. 4 Effect of MG LR on the activities of CAT in the hepatocytes of *C. carpio*

■处理, ◆对照

## 2.5 GST 活性变化

培养的肝细胞 GST 活性在 MC-LR 处理后有明显的下降(图 5), 对照 GST 活性也下降。随后二者下降的时间顺序和幅度无大差异。

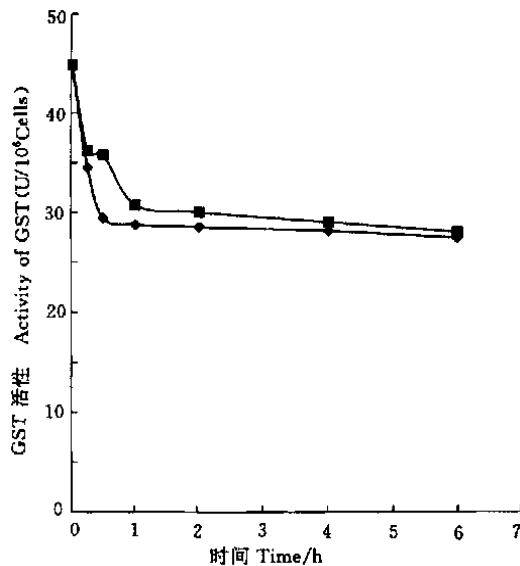


图 5 MC-LR 对鲤肝细胞 GST 活性的影响

Fig. 5 Effect of MG-LR in the activities of GST in the hepatocytes of *C. carpio*

■处理, ◆对照

## 2.6 GSH-Px 活性变化

MC-LR 处理后, 肝细胞培养物 GSH-Px 活性在 1h 内有明显升高, 1h 后逐渐下降, 在 1h—6h 期间活性下降幅度不大(图 6); 对照 GSH-Px 活性变化规律同处理, 但在 1h 内, 对照 GSH-Px 活性升高幅度明显低于处理, 1h 后二者下降趋势和幅度相似。

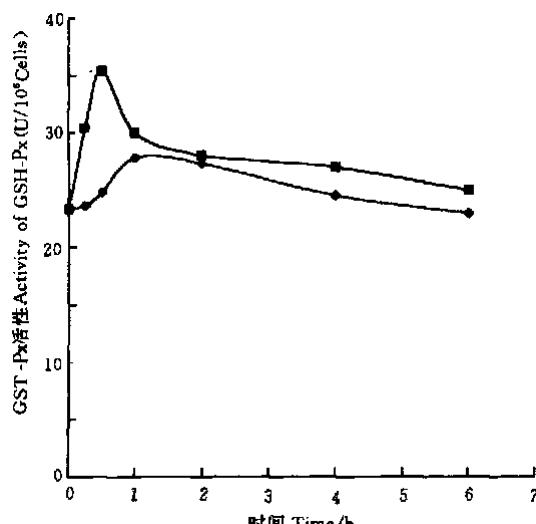


图 6 MG-LR 对鲤肝细胞 GSH-Px 活性影响

Fig. 6 Effect of MG-LR on the activities of GSH-Px in the hepatocytes of *C. carpio*

■处理, ◆对照

## 3 讨论

实验结果表明,  $10\mu\text{g}/\text{L}$  MC-LR 处理鲤肝细胞培养物, 15min 后, ROS 含量就有明显升高, 在 1—2h 时间段内升高幅度最大; 2h 后, ROS 含量仍在升高, 而对照 ROS 只有平缓的略微升高。由此可见, MC-LR 处理后, 首先在很快的时间内就引起了培养的肝细胞 ROS 含量的明显升高, 这必定会对肝细胞造成不同程度的损伤, 从而使肝细胞处于氧化应激状态, 但肝细胞的抗氧化初级防御系统迅速做出反应: GSH 含量迅速下降, 说明 GSH 参加了对活性氧的清除, SOD 和 CAT 的活性在短时间(15min—1h)内都有快速、明显的升高, 即 SOD 和 CAT 也很快参加了对 ROS 的消除, 执行肝细胞初级防御系统的功能。GHS-Px 活性变化的结果表明, 在 1h 内 GSH-Px 也参与对 ROS 的清除, 但 1h 后其活性明显下降, 1.5h 后趋于平缓下降, 原因还待进一步研究。

另外, GST 活性变化似与 MC-LR 处理无关, 这一结果与徐立红的结果相符, 说明 GST 可能不参与 MC-LR 毒性的解除反应。

研究结果表明, MC-LR 处理培养的鲤肝细胞后, 短时间内通过肝细胞膜上的胆汁酸转运蛋白迅速进入肝细胞内, 首先抑制了肝细胞质内的蛋白磷酸酶(PP1, PP2A)的活性, 相应激活了蛋白激酶(PKC)活性, 打破了细胞内原有的脱磷酸化/磷酸化的平衡。这不仅导致细胞内许多功能蛋白的过磷酸化, 也促进了细胞质内  $\text{Ca}^{2+}$  信号的过量释放, 可能诱发了肝细胞 ROS 含量的迅速上升, 使肝细胞处于氧化应激状态。与此同时肝细胞抗氧化初级防御系统迅速做出反应, 即 SOD、CAT 和 GSH-Px 活性迅速升高, 以清除 ROS, 而这三种酶活性的升高, 势必会消耗大量的 GSH, GSH 含量的下降以至耗竭, 则必定使肝细胞抗氧化能力下降。随着时间的延长, 肝细胞抗氧化能力终会丧失, 从而不能清除过剩的 ROS; 过量的 ROS 则会导致肝细胞脂质过氧化、巯基状态的改变及酶活性的抑制等初级作用; 继而使肝细胞膜的通透性和结构发生改变, 导致肝细胞内质网受损、细胞骨架的改变和破坏及细胞核的损伤, 最后引起细胞膜发泡(Blebbing)和细胞凋亡(Apoptosis)。

## 参考文献:

- [1] Carmichael W W. The toxins of cyanobacteria [J]. *Sci. Am.*, 1994, 270: 64—72
- [2] Xu L H, Zhang Y Y. Recent developments in the study of the molec

ular intoxication mechanism of microcystins. [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1993, 17(4): 365-374. [徐立红, 张元. 微囊藻毒素分子致毒机理研究进展[J]. 水生生物学报, 1993, 17(4): 365-374]

[3] Hallegréff G M. A review of harmful algal bloom and their apparent global increase [J]. *Phycologia*, 1993, 32(2): 79

[4] Dawson R M. The toxicology of microcystins [J]. *Toxicon*, 1998, 36(7): 953-962

[5] Codd G A, Bell S G, Knyaz K, et al. Cyanobacterial toxin, exposure routes and human health [J]. *Eur. J. Phrol.*, 1999, 34:405

[6] Falconer I R, Beresford A, Runnar M T C. Evidence of liver damage in a human population exposed to toxin from a bloom of the blue green alga *Microcystis aeruginosa* in a drinking water supply reservoir [J]. *Med. J. Aust.*, 1983, 1: 511

[7] Yu S Z. Drinking water and primary liver cancer [M]. Beijing: Academic Press, 1989

[8] Bell S G, Codd G A. Cyanobacterial toxin and human health [J]. *Rev. Med. Microbiol.*, 1994, 5: 256-264

[9] Takenaka S, Otsu R. Effects of L-cysteine and reduced glutathione on the toxicity of microcystin-LR: the effect for acute liver failure and inhibition of protein phosphatase 2A activity [J]. *Aquatic Toxicology*, 1999, 48:65-68

## RESPONSES OF ANTIOXIDANT SYSTEMS IN THE HEPATOCYTES OF COMMON CARP (*CYPRINUS CARPIO* L.) TO THE TOXICITY OF MICROCYSTIN-LR

LI Xiao-Yu<sup>1</sup>, LIU Yong-Ding<sup>2</sup>, SONG Li-Rong<sup>2</sup> and QIAO Zhi-Gang<sup>1</sup>

(1. College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453002; 2 Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

**Abstract:** The freshwater, bloom-forming cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis aeruginosa* produces a peptide hepatotoxin (microcystins, MC), which causes the damage of animal liver. Recently, toxic *Microcystis* blooms frequently occur in the eutrophic lake and have caused many troubles to the environment in China. Microcystins remained in water supply also become the severe threat to people health. Microcystin-LR from *Microcystis* was isolated and purified with high performance liquid chromatography (HPLC) and its toxicity to mouse and fish liver were partly studied (Li et al., 2001). In this study, six indexes (Reactive oxygen species, Glutathione, Superoxide dismutase, Catalase, Glutathione peroxide and Glutathione S-transferase) in common carp hepatocytes were determined with the kits supplied by the Nanjing Bioengineering Institute when the cells were exposed to 10 $\mu$ g/L microcystin-LR. The results showed that Reactive oxygen species (ROS) contents increased obviously after 6h exposure to the toxin. In contrast, Glutathione (GSH) levels in the hepatocytes exposed to microcystin-LR decreased by 47% compared with the control. The activities of Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT) and Glutathione peroxide (GSH-Px) increased after 6h exposure to microcystin-LR, but Glutathione S-transferase (GST) activity showed no difference with the control. These results suggested that the toxicity of microcystin-LR caused the increase of ROS contents and the depletion of GSH in hepatocytes exposed to the toxin and these changes led to oxidant shock in hepatocytes. Activities increases of SOD, CAT and GSH-Px revealed that these three kinds of antioxidant enzymes might play important roles in eliminating the excessive ROS. From the present study, we could infer the possible toxicity mechanism of microcystin-LR on the common carp hepatocytes. MC can potently inhibit protein phosphatase type 1 and 2A after the toxin were transported to cytoplasm by the bile acid transporter in the cell membrane of hepatocytes and the inhibition may disturb the cellular phosphorylation balance, cause the marked increase of ROS contents and the depletion of GSH in hepatocytes. As a result, these changes would lead to oxidant shock in the hepatocytes. Although antioxidant enzymes (SOD, CAT and GSH-Px) had played their roles in eliminating cytosolic ROS and regenerating GSH, they could not prevail over the oxidant stress induced by the toxin. Therefore, these effects caused the damages of hepatocytes, leading to apoptosis and even necrosis of cells.

**Key words:** Microcystin-LR; *Cyprinus carpio*; Hepatocyte; Anti-oxidation system; Toxicity