

研究简报

鱼体中谷胱甘肽对微囊藻毒素的 解毒作用的初步研究*

张甬元 徐立红 周炳升 徐 盈

(中国科学院水生生物研究所,淡水生态与生物技术国家重点实验室,武汉 430072)

原田健一

(日本名城大学药学部,名古屋 468)

PRELIMINARY STUDIES ON THE ROLE OF GSH IN DETOXIFICATION OF MICROCYSTIN-LR IN FISH

Zhang Yongyuan, Xu Lihong, Zhou Bingsheng and Xu Ying

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences The State Key Laboratory of Freshwater Ecology and
Biotechnology, Wuhan 430072)

Ken-ichi Harada

(Meijo University, Faculty of Pharmacy, Nagoya 468)

关键词 谷胱甘肽,微囊藻毒素,解毒作用

Key words glutathione, microcystins, detoxification

谷胱甘肽(glutathione, 简写 GSH)是广泛存在于动物细胞及绝大部分植物和细菌中的三肽,与生物体内抗离子辐射、维持蛋白的巯基状态等密切相关;在毒理学研究中更注重它的另一生物功能:解毒作用。它是生物解毒系统第二阶段反应中主要的结合物质之一,尤其与非生物物质的结合,对许多毒物的毒性影响具有保护作用。GSH 在外源性化合物代谢中起着重要的解毒作用已为许多研究者公认。

微囊藻毒素(简称 MCYST)是蓝藻中的某些属产生的次生代谢产物,在发生水华的水体中该类毒素大量产生,由于水华发生十分普遍,而且近年来发现该毒素是一种极强的肝肿瘤促进剂,对它的研究更受到越来越多的重视。关于它在体内解毒的情况,目前尚未见到报道。Kondo 等人的研究证明在化学反应中毒素可与 GSH 结合形成一种新的物质,而这种新物质毒性大大降低,推测 GSH 可能参与了体内毒素解毒作用^[1]。本实验室的研究已表明微囊藻毒素 LR 对草鱼肝细胞超微结构有明显的影晌,即已从细胞水平上证明了 LR 对鱼的毒性作用^[2],根据这一结果,本研究用预先给予受试鱼 GSH 的方法对鱼进行预保护,然后经腹腔注入毒素,与仅注入毒素或 GSH 的鱼比较,然后从超微结构观察判断 GSH 是否对毒素的毒性影响具有保护作用。

* 国家自然科学基金资助,课题号:39370151。

1994年4月8日收到。

1 材料与方法

实验草鱼[Ctenopharyngodon idellus, (Curier et Valenciennes)]由中国科学院水生生物研究所养殖场提供。鱼体重 25—30g 体长 9—10cm, 暂养期间喂食人工饵料, 水温 18—22℃, 一周后用于实验。将鱼分为四组, A、B、C 组分别注射蒸馏水、剂量为 8mg/kg 的 GSH、剂量为 900μg/kg 的 MCYST-LR, D 组先对鱼注射剂量与 B 组相同的 GSH, 两小时后注入与 C 组剂量相同的毒素 MCYST-LR。以上四组分别在毒素被注入 6h、24h、48h 和 72h 后取样, 经固定、包埋、切片、染色等处理, 在光镜、电镜下观察。

2 结果与讨论

实验期间, 注射蒸馏水和注射 GSH 的对照组无鱼死亡, 鱼肝脏外观正常, 超微结构无改变。注射毒素 LR 的鱼肝脏超微结构变化与本实验室的报道一致^[9], 注射 LR 和 LR+GSH 组的鱼肝脏超微结构见图版 I: 1—6, 将这两组鱼的肝脏结构变化进行比较, 从表 1 结果可看出, 在注入毒素前 2h 注射了 GSH 的鱼, 与仅注入 LR 的相比, 其肝脏结构没有明显改变, 基本与对照组相同, 毒素没有对其超微结构产生影响, 因此可以肯定预先补充 GSH 可使鱼抵抗微囊藻毒素的毒性作用。这一结果从另一方面也表明了毒素的危害: 由于消耗机体内的 GSH 而可能会破坏生物体的解毒机制。

表 1 注射 LR 组与注射 GSH+LR 组观察结果比较

Tab.1 Comparison of viewing results of liver in fish inject with LR and GSH+LR

时间 Time		注射 LR (C 组) Inject LR (C group)	注射 GSH+LR (D 组) Inject GSH+LR (D group)
肉眼观察 Visual view	6h	肝颜色加深, 形状完整	无明显改变
	24h	肝充血加剧, 肝易碎	无显著充血
	72h	肝呈深紫色, 难分辨出肝小叶	肝形状完整
光镜观察 Light microscope view	6h	肝细胞解离, 细胞间出现间隙肝细胞索破坏	形态结构与 H ₂ O 对照组相似
	24h	肝充血, 细胞大量坏死	肝脏内无显著充血, 肝细胞亦无分离
	72h	肝细胞大量坏死, 血细胞堆积成团	肝脏结构趋于正常
电镜观察 Electronic microscope view	6h	肝细胞解离, 形成许多细胞间隙并可见微丝	肝脏超微结构与 GSH 对照组相似
	24h	与光镜观察类似	肝细胞无分离, 无充血
	72h	肝细胞崩解, 死亡, 细胞间有许多血细胞分布	肝细胞无分离及充血, 肝细胞超微结构保存较好

正常情况下, GSH 在一定细胞或组织中含量是相对稳定的, 如果消耗速度异常增加, 则胞内 GSH 含量会降低, 而引起消耗的原因之一就是由于存在着可与 GSH 结合的底物, 某些外来污染物或其代谢物便是属于这种底物, 许多有毒物质通过与 GSH 结合而解毒。有人提出细胞抗化学物毒性的能力取决于它维持 GSH 贮存量的能力。验证 GSH 是否参与了解毒过程一般可从两方面来进行, 即加入 GSH 消耗剂 (GSH 合成抑制剂) 观察物质的毒性是否增加, 或对生物补充 GSH, 观察有毒物质的毒性是否降低。Gallagher 在研究中用给斑点叉尾鲷预注射 GSH 合成抑制剂 BSO 和 DEM 的方法证明 2, 4, 5, 6-四氯异苯二甲腈的毒性增加了三倍^[3], 而 GSH 预保护研究指出, 对小鼠在两小时前注射 GSH, 可完全保护小鼠免受微囊藻毒素 YM 的毒性影响^[4], 毒素致毒的鼠肝细胞中 GSH 随时间、剂量而消耗^[5], 这证明 GSH 的确与毒素的解毒作用有关。多项研究表明, 机体调节有毒物质毒性的一个关键要素是机体代谢毒物的能力, 有人已提出 GSH 应成为毒理实验中常规的检测参数^[6], 这不仅表明 GSH 可以反应机体的中毒状况, 而且也反映了 GSH 在解毒过程中的重要作用。因此, 进一步研究 GSH 在微囊藻毒素致毒过程中的解毒作用, 对于全面了解该毒素的可能危害是有着十分重要的意义的。

参 考 文 献

- [1] Kondo F et al. Formation, characterization and toxicity of the glutathione and cysteine conjugates of toxic heptapeptide microcystins. *Chem. Res. Toxicol* 1992, 5(5): 591—596.
- [2] Zhou B et al. The effect of microcystin-LR on the liver ultrastructure of grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*. 1993, Annual Report of FEBL 1992, 97—105.
- [3] Gallagher E P et al. The protective role of glutathione in chlorothalonil-induced toxicity to channel catfish. *Aquatic Toxicology*, 1992, 23: 155—168.
- [4] Hermansky S et al. Evaluation of potential chemoprotectants against microcystin-LR hepatotoxicity in mice. *J Appl Toxicol*, 1991, 11: 65—74.
- [5] Maria T C et al. Injury to hepatocytes induced by a peptide toxin from the cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon*, 1987, 25: 1235—1239.
- [6] 江泉观. 基础毒理学. 北京: 化学工业出版社, 1991, p107.

图 版 说 明

1. B 组, 注射 GSH 的草鱼肝脏光镜图像, $\times 400$; 2. C 组, 注射微囊藻毒素-LR 72 小时, 示肝脏内有大量红细胞(长箭头), 肝细胞崩解(短箭头), $\times 400$; 3. D 组, 注射微囊藻毒素-LR 72 小时, 肝脏内无充血, 肝细胞亦无分离, $\times 400$; 4. C 组, 注射微囊藻毒素-LR 6 小时电镜图像, 肝细胞相互分离并形成了非细胞空间, 在细胞间隙可观察到微丝(MF), $\times 7000$; 5. C 组, 注射微囊藻毒素-LR 72 小时, 可见肝脏内严重充血, 所有肝细胞崩解死亡, $\times 7000$, 肝细胞(箭头), 红细胞(E); 6. D 组, 注射微囊藻毒素-LR 72 小时, 肝细胞, 可见保护较好的肝细胞超微结构, $\times 7000$.

1. Group B, light micrograph of the liver of grass carp injected with GSH, $\times 400$; 2. Group C, 72h after microcystin-LR injection, showing a large accumulation of blood cells (long arrow) and the collapse of hepatocytes (short arrow), $\times 400$; 3. Group D, 72h after microcystin-LR injection, no blood cell congestion was observed and no separation of the hepatocytes, $\times 400$; 4. Group C, electron micrograph of 6h after microcystin-LR injection, hepatocytes separated and non-cell spaces formed with microfilaments (MF) in the spaces, $\times 7000$; 5. Group C, 72h after microcystin-LR injection, a severe congestion in fish liver and all the hepatocytes (arrow) collapsed. red blood cell (E), $\times 7000$; 6. Group D, 72h after microcystin-LR injection, the ultrastructure of the hepatocytes were protected very well, $\times 7000$.