

综述

水生生物对微囊藻毒素去毒分子机理及调控因子研究

于 燕 梁旭方 廖婉琴 韩博平

(暨南大学生命科学技术学院, 广州 510632)

ADVANCE IN STUDIES ON MOLECULAR MECHANISM AND REGULATORY FACTORS OF MICROCYSTIN DETOXICATION IN AQUATIC ORGANISM

YU Yan, LIANG Xu-Fang, LIAO Wan-Qin and HAN Bo-Ping

(College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632)

关键词: 微囊藻毒素; 去毒; 谷胱甘肽 S-转移酶; 加合; 调控因子

Key words: Microcystin; Detoxication; Glutathione S-Transferase (GST); Conjugation; Regulatory Factors

中图分类号: Q948.8 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2007)05-0738-06

近年来, 随着工农业的不断发展, 排入水体的各种污染物不断增加, 加速了淡水水域的富营养化进程, 使得浮游藻类大量繁殖, 有害藻类水华频繁发生, 世界各地不断有藻类污染水体引起人畜患病甚至死亡的事件报道。在淡水藻类中, 毒性最强、污染范围最广的为蓝藻门, 目前确定的有毒藻种包括铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*)、水华鱼腥藻 (*Anabaena flos-aquae*)、水华束丝藻 (*Aphanizomenon flos-aquae*)、阿氏颤藻 (*Oscillatoria agardii*)、红色颤藻 (*Oscillatoria rubescens*)、泡沫节球藻 (*Nodularia spumigena*) 等。这些藻类所产生的毒素根据其致毒作用不同可分为三类: 多肽肝毒素、生物碱类神经毒素及脂多糖内毒素^[1], 其中肝毒素的出现最为广泛且具有强促癌作用。肝毒素主要由铜绿微囊藻、水华鱼腥藻产生的微囊藻毒素 (Microcystin, MC) 和泡沫节球藻产生的节球藻毒素 (Nodularin, NODLN) 组成。淡水系统中, 微囊藻毒素是肝毒素中危害最为严重的一类。有资料表明, 饮用水中来自淡水系统的微囊藻毒素污染, 很可能是除肝炎病毒和黄曲霉毒素以外导致肝癌的第三个重要原因^[2]。自然水体中的微囊藻毒素已越来越多地影响到人类的饮用水安全。针对这一问题, 目前采用的多是通过物理化学方法进行处理, 虽然可以达到较好的效果, 但其缺陷是成本太高。因此, 研究水生生物对微囊藻毒素的去毒分子机理及相关调控因子, 用生态学方法解决微囊藻毒素对自然水体的污染问题意义

重大。

1 水生生物对微囊藻毒素的去毒能力

微囊藻毒素的主体结构为环七肽, 共有 60 多种异构体, 毒性较大的是 LR、YR、RR。这些毒素具有相似的生物学功能, 会造成肝细胞的损伤, 严重者还会引起肝内出血并导致动物死亡。

研究表明, 不同水生生物对微囊藻毒素的去毒能力不同。水生植物是水生生态系统中的初级生产者, 直接与环境中的微囊藻毒素接触, 不同的水生植物对藻毒素的聚集能力有所差异, 与其表面积、对毒素的吸收能力以及被吸收的毒素所需的清除时间有关。有些藻类, 例如细长聚球藻具有较强的净化毒素的能力, 毒素处理 1 天后, 培养基中的藻毒素含量只有初始浓度的 21.7%; 处理 6 天后, 培养基中的毒素仅剩 8.18%^[3]。

蚌、贝类以及鳌虾等有壳类无脊椎动物对藻毒素的清除比较缓慢, 有富集毒素的作用。把微囊藻作为斑马贻贝的单一食料时, 一星期后观察到藻毒素在贻贝中达到最大含量, 并在接下来的一周内仍保持很高含量, 在第三周时含量开始降低, 但在其体内长时间高浓度存在的微囊藻毒素并未引起贻贝的可见性损伤^[4]。

与蚌及贝类相比, 鱼类对微囊藻毒素的结合量较低且清

收稿日期: 2005-12-12; 修订日期: 2007-01-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(30670367); 广东省水文局蓝藻重点项目; 广东省科技计划项目(2005B20301005); 广东省自然科学基金项目(031886); 教育部留学回国人员科研启动资金项目资助

作者简介: 于燕(1981—), 女, 汉族, 山东烟台人; 硕士生; 主要从事分子生态学研究。E-mail: yuyan405@yahoo.com.cn

除速度较快, 实验条件下用微囊藻填喂虹鳟发现, 1 h 后毒素在其肝脏内迅速聚集, 并且在随后的 24 h 内大部分被排出体外。何家莞等^[5]研究发现, 鲢鱼滤食大量微囊藻细胞, 但其消化程度很低, 大部分藻细胞被完整地排出, 粪便呈绿色; 而罗非鱼则消化吸收进入消化道的大部分藻细胞, 粪便呈红褐色。收集两种鱼的粪便进行毒性测试, 发现鲢鱼粪便藻较喂食藻毒性降低约 2 倍, 而罗非鱼粪便藻较喂食藻毒性降低 4.5 倍。由此可见, 罗非鱼有较强的去毒能力, 更适应毒素压力下的生存。投喂微囊藻后, 鲢鱼肝细胞肿大且线粒体出现嵴裂甚至消失; 而罗非鱼的肝细胞只是略有肿大, 线粒体无明显变化, 可见罗非鱼较鲢鱼有更强的毒素耐受能力。毒素半致死量实验结果表明, 鲢鱼微囊藻毒素半致死量约为草鱼的 3 倍, 罗非鱼则为草鱼的 5 倍。注射微囊藻毒素后草鱼肝细胞高度肿大, 基质高度水肿, 细胞器分布松散, 胞核肿胀, 整个细胞都处于严重的中毒状态; 鲢鱼的肝细胞情况稍好, 细胞超微结构变化基本与草鱼相似但细胞核变化不明显; 罗非鱼的肝细胞在这三者中受损最轻, 仅部分细胞器结构变化。可见在毒素压力存在下, 草鱼对毒素最为敏感而耐受力最差, 鲢鱼居中, 罗非鱼最不敏感而耐受力最强。这三种鱼对微囊藻毒素的耐受性不同, 很可能与这三种鱼肝脏去毒能力的大小不同有关。

由于某些鱼类可以快速吸收、清除微囊藻毒素, 因而利用鱼类通过生物操纵方式实现清除蓝藻毒素、净化水质, 一直是研究人员的工作重点。我国学者用围隔等实验湖沼学方法在东湖进行长年研究, 发现鲢、鳙在控制微囊藻等蓝藻水华方面有重要作用, 并提出了通过放养食浮游生物的鲢、鳙直接控制微囊藻等蓝藻水华的非经典生物操纵理论^[6,7]。利用鲢、鳙控制藻类、改善水质的生态作用也为国内外其他大量实验研究所证实^[5,8]。

2 微囊藻毒素在水生生物体内去毒代谢的分子机理

微囊藻毒素在水生生物体内的去毒代谢主要分为两大类: 一类是在水生动植物体内, 微囊藻毒素在可溶性谷胱甘肽 S-转移酶 (sGST) 的催化下与谷胱甘肽 (GSH) 发生加合反应, 毒性降低, 直接经排泄系统排出体外, 另一类则是在水栖微生物体内, 微囊藻毒素在某些水栖微生物独有的微囊藻毒素酶催化下开环降解。

2.1 微囊藻毒素在水生动植物体内的去毒代谢

谷胱甘肽 S-转移酶超家族 (GSTs) 是生物体内普遍存在的多基因酶超家族, 在不同种类的生物体中起着相似的生物学功能, 主要参与抗生素、毒素及组织损伤产生的内源毒素的去毒过程, 是生物体内去毒的主要酶系。哺乳动物 GSTs 现在已发现至少有 9 种, 其中 8 种 (Alpha、Mu、Pi、Theta、Sigma、Zeta、Kappa 和 Omega) 位于胞质中, 又称为可溶性谷胱甘肽 S-转移酶, 而另 1 种位于微粒体中, 又称为微粒体谷胱甘肽 S-转移酶 (mGST)。

早在 1992 年, 就有报道在强碱性非酶促反应 (Michael 反应)

约为 1302。但水生生物体的内环境达不到这种强碱性的 pH 环境要求, 微囊藻毒素在水生生物体内的降解究竟是通过什么方式实现的, 一直是研究的热点。1998 年 Pflugmacher 等^[9]分别选取不同途径接触微囊藻毒素的水生动植物, 获取其组织提取液与¹⁴C 标记的微囊藻毒素反应。研究结果显示, 各种水生动植物 (包括水生植物、甲壳动物、软体动物、鱼卵和成鱼等) 组织提取液中的 sGST 都具有催化微囊藻毒素与 GSH 发生加合反应的活性。经 HPLC 和 MALDI-TOF 质谱分析, 加合物荷质比为 1302, 与 Michael 反应条件下形成的加合物分子量相同, 并且还发现藻毒素对 CDNB-sGST 加合反应的强烈抑制作用 (CDNB 是 sGST 的标准反应底物), 从而证实在水生动植物体内 sGST 催化微囊藻毒素与 GSH 的加合反应。这一反应完成了微囊藻毒素在水生动植物体内代谢的关键步骤, 不仅中和了微囊藻毒素的亲电位点, 使其毒性减弱, 而且使微囊藻毒素水溶性增加, 有利于其通过排泄系统排出体外。

Beattie 等^[10]的研究间接证明 sGST 在去毒过程中的确扮演了重要角色。他将三个发育阶段的卤虫暴露在含有微囊藻毒素的水体环境中一段时间, 发现其酶提取液中 sGST 的活性显著升高。Best 等^[11]在斑马鱼实验中也发现了类似的结果。这表明 sGST 参与了微囊藻毒素的代谢过程, 这一现象的分子机理有以下几种解释: a. 毒素压力存在下, 机体产生的 sGST 构象变化, 但是由于 sGST 的分子量不大并且考虑到酶液的制备方法, 所以这种假设的影响可能不是主要的; b. 暴露在毒素存在的环境下, sGST 蛋白转录后修饰发生变化, 由于 sGST 酶蛋白的氨基可以发生磷酸化, 藻毒素抑制蛋白磷酸酶的活性, 所以 sGST 活性的变化可能与其转录后修饰加工有关; c. sGST 基因在外界环境毒素压力的影响下, 转录及表达加强, 生成更多的 sGST 酶蛋白。

Gehringer 等^[12]的实验结果为第三种解释提供了证据。给予小鼠一定剂量的微囊藻毒素处理后, 获取不同染毒时间小鼠的 mRNA, 反转录得到 cDNA 并对其进行定量。实验数据显示, 谷氨酸半胱氨酸连接酶、γ-谷氨酸半胱氨酸合成酶、谷胱甘肽合成酶、sGST μ 、sGST π 、谷胱甘肽过氧化物酶 (GPX) 转录表达增强, 并且一些辅助 GPX 转录的含硒蛋白质的转录表达也有所增强 (推测可能是亚硒酸钠预处理可以对抗毒素损伤机体^[13]的原因所致)。针对这一实验结果, Gehringer 就其分子机理提出如下解释: 微囊藻毒素进入肝细胞后, 使细胞中产生大量的活性氧分子, 这些活性氧分子将脂质分子氧化为过氧化脂质分子 (ROOH), ROOH 在 GPX 的作用下, 被 GSH 还原生成 ROH, 同时产生的 GSSG 经谷胱甘肽还原酶催化生成两分子 GSH, 而充足的 GSH 供应则是 GST 对微囊藻毒素进行加合去毒的基础, 这就很好地解释了实验中 sGST、GPX 等去毒相关基因转录表达同时增强的现象。

Gehringer 等^[12]进一步研究发现, 正常生命状态下, 肝糖原动员进入磷酸戊糖途径产生的 NADPH 为过氧化脂质分子提供还原动力, 减轻活性氧分子带来的氧化压力, 而在急性

脏的损伤^[14], 推测其原因可能是: VitE 可以还原 ROOH, 自身生成醌化 VitE, 再经维生素 C 还原为 VitE, 减轻去毒系统的氧化压力。另外, 机体处于毒素压力的环境中, 不但参与去毒加合反应的相关基因表达增强, 在我们的定量表达实验中发现, 为了适应毒素压力下的生存, 肝脏内一些对活性氧分子敏感的抗毒相关基因的转录表达也显著增强, 例如, 肝细胞抗凋亡因子解偶连蛋白 2 (UCP2)^[15, 16]。

2.2 微囊藻毒素在水栖微生物体内的降解

蓝藻水华发生后, 一小部分进入水生动植物体内, 经加合反应后毒性降低再次排到水体中, 另外大部分一直存在于水体当中。当光照充足时, 藻毒素可以进行缓慢的光化学降解或异构化使其毒性明显降低, 但在自然水体中必须有水溶性的细胞色素或腐殖质等光敏剂的存在, 才能有效地进行光降解^[17, 18]。腐殖质等光敏剂吸收日光或复合紫外光中的 290 nm 到可见光这一波段的光, 形成高活性的 O₃ 和 H₂O₂ 等物质, 这些强氧化性的物质可以打开微囊藻毒素的环状结构, 促使微囊藻毒素降解。可是光降解受到许多条件的限制, 如光照强度、光敏剂的多少等。发生水华的水体通常透明度很低, 因此藻毒素的光降解很难顺利进行, 所以水体中大部分微囊藻毒素的降解必定存在其他更为有效的方式, 研究发现通过水栖微生物进行降解才是水体中微囊藻毒素降解的主要途径。

由于微囊藻毒素的环状结构和间隔双键非常牢固, 并不是所有的微生物都能对其进行降解, 只有一些可以产生微囊藻毒素酶 (microcystinase) 的特殊微生物菌种才具备降解藻毒素的能力, 这也是藻毒素能够在自然水体中长期存在的一个重要原因。Takenaka 和 Watanabe^[19]发现从自然水体中分离出的铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 对 MG-LR 有降解能力, 在初始 50 mg/L 高初始浓度下, 20 d 的除去率为 90% 以上, 并发现铜绿假单胞菌所分泌的碱性蛋白酶 (Alkaline protease) 主要负责催化降解微囊藻毒素。Park 等^[20]发现了一株具备对微囊藻毒素有降解能力的鞘氨醇单胞菌 (*Sphingomonas*), 对藻毒素 MG-RR 和 MG-LR 的最大日降解速率分别达到 1310 mg/L 和 514 mg/L。闫海等^[21]从云南滇池底泥中分离出了能够降解微囊藻毒素的微生物纯菌种, 经中国科学院微生物研究所鉴定为 *Ralstonia solanacearum*。研究发现此菌种在 3 天内可将初始浓度分别为 5012 mg/L 和 3011 mg/L 的藻毒素 MG-RR 和 MG-LR 全部降解, 日平均降解速率分别高达 1617 mg/L 和 914 mg/L。

澳大利亚学者 Boume 等^[22]研究了鞘氨醇单胞菌对藻毒素 MG-LR 的降解途径, 发现环状 MG-LR 首先被开环变成线型 MG-LR, 然后再进一步降解成四肽化合物, 并且还发现这两种中间代谢产物抑制 50% 鸡脑蛋白磷酸酶活性的浓度都远远高于 MG-LR, 说明经代谢产生的中间代谢产物毒性明显降低, 可见降解的过程就是一个去毒的过程。他们进一步研究发现, 在鞘氨醇单胞菌降解 MG-LR 过程中, 至少有 3 种酶参与了 MG-LR 的催化降解反应, 并将对应的基因进行了克隆和分

5. 8 kb, 包括 *mlrA*、*mlrB*、*mlrC*、*mlrD* 四个基因, 其中 *mlrA* 编码微囊藻毒素酶 MlrA, 一种金属蛋白酶, 它是降解过程中的第一个酶, 是由 336 个残基组成的肽链内切酶, 在该酶的催化下 MG-LR 开环变成线状的 MG-LR; 位于 *mlrA* 下游且具有相同翻译方向的是 *mlrD*, 是一个伴随在 *mlrA* 旁边的寡肽转运子; *mlrB* 位于它们的下游并具有相反翻译方向, 由它编码的酶 MlrB (402 个残基), 可以将线形 MG-LR 分裂成四肽; 最后一个基因 *mlrC* 位于 *mlrA* 上游具有相反的翻译方向, 它编码的酶 MlrC (507 个残基), 也是一种金属蛋白酶, 可以降解四肽。

Saito^[24]等通过 PCR 监测 *mlrA* 基因, 发现具有降解能力的 Y2 菌、MB-1 菌都含有 *mlrA* 基因, 且通过 16S rDNA 分析发现其属于鞘氨醇单胞菌属, 并推测那些很接近鞘氨醇单胞菌属而且含有 *mlrA* 基因的细菌可能都具有降解微囊藻毒素的能力。另有许多学者对混合菌降解微囊藻毒素进行了研究。吕锡武等^[25]采用序批式生物膜反应器对 3 种微囊藻毒素进行降解的实验显示, 混合菌对其有一定的降解作用, 且好氧条件好于厌氧条件, 但在 3 天内微囊藻毒素的去除量都低于 400 μg/L。敖鸿毅等^[26]利用双协菌 (分别属 *Basidiomycetes* 和 *Geotrichum candidum*) 降解微囊藻毒素并对其进行动力学研究发现, 双协菌在 28—32 °C 条件下进行固态发酵培养, 2 天后毒素含量明显降低, 6 天后基质中未检测出毒素存在, 毒素的去除率达到 91% 以上。该双协菌是靠营养限制来启动降解过程的, 当将其接入发酵基质中, 由于微生物对营养限制作出应急性应答反应而产生一套酶系。在好氧条件下, 依赖于一个主要由该双协菌细胞分泌产生的酶组成的细胞外降解体系, 借助自身形成的 H₂O₂ 激活并靠酶触发启动一系列的自由基链式反应, 在细胞外对基质中的微囊藻毒素进行彻底的氧化分解。

3 水生生物微囊藻毒素去毒代谢调控因子

目前, 我们对水生生物微囊藻毒素去毒代谢相关基因的研究还处于起步阶段, 这些基因的表达调控元件、调控机理都尚未明了, 也是目前该领域的研究热点所在。有研究发现, 自然水体中的某些物质, 特别是那些由藻类水华产生的物质, 可以通过调节水生动植物去毒代谢相关基因的转录表达, 影响其去毒效率。

脂多糖 (LPS) 广泛存在于革兰氏阴性菌 (包括水体中产生有毒水华的蓝藻, 如微囊藻) 的表面及周围。LPS 通常以大分子聚合体的形式存在, 各亚基以疏水键相连。这些大分子一般都具极强的致炎性, 会刺激人及动物大量炎症因子的释放, 包括 TNF-α、IFN-γ、IL-1、IL-6、白三烯、前列腺素、NO 等。在哺乳动物中, Choi 等^[27]研究证实 LPS 抑制小鼠 sGST 基因的表达。Best 等^[15]研究发现, 不论是从纯的蓝藻还是蓝藻水华中提取的 LPS 都明显降低斑马鱼胚胎中 sGST 的活性, 而且这种抑制作用只在活体处理时才存在, 推测 LPS 可能影响 sGST 的合成过程, 即可能与 sGST 基因的转录调控有关。虹

子浓度, 破坏原有的渗透压平衡, 表现为虹鳟饮水频率提高, 因而最终导致其摄入的毒素量增加。由此可见, 水体中 LPS 的存在将会加重水生生物的去毒压力。

哺乳动物中, 对于外源物质激活 *GST* 基因的表达调控研究已有相当的进展。Rushmore 等^[29]利用基因敲除技术证实, 在大鼠 *GST1-Ya* 亚基基因的 5' 侧翼区存在 5 个独立的调控元件。第一个调控元件是位于 -860 至 -850 之间的核苷酸序列, 其核心序列能被肝脏特异转录调控因子 HNF1 (Hepatocyte nuclear factor 1) 识别^[30,31], 与 *Ya* 亚基基因的最大基础表达水平有关。在 -775 至 -755 核苷酸之间存在着第二个起增强子作用的调控元件, 包含一个 HNF4 (Hepatocyte nuclear factor 4) 识别序列^[32]。借助计算机对 *GST1-Ya* 亚基基因的启动子序列进行分析, 发现还有另外两个调控元件: 异生素反应元件 XRE (Xenobiotic responsive element) 和糖皮质激素反应元件 GRE (Glucocorticoid responsive element), 它们分别与外源性物质和糖皮质激素对 *Ya* 亚基基因的表达调控有关。XRE 的核心序列 (GCGTG) 位于 HNF1 序列的上游 -908 至 -899 核苷酸之间^[30,31], GRE 位于 -1609 至 -1595 核苷酸之间^[30]。XRE 可以被芳香烃 (Ah) 受体复合物识别, 并通过 Ah 受体与多环芳香族化合物的高亲和性结合而介导多环芳烃等外源性物质对 *Ya* 亚基基因转录的激活^[32-36]。随后证实的第 5 个调控元件为抗氧化剂反应元件 ARE (Antioxidant responsive element), 位于 -722 至 -682 之间的核苷酸序列^[37]。在 Ah 受体缺乏的情况下, 它可激活芳香族复合物或酚类抗氧化剂对 *GST1-Ya* 亚基基因的调控作用。经过对 ARE 进行 5' 和 3' 缺失及突变分析, 发现 ARE 的核心序列为: 5'-PuGF-GAC2NNNGG 3' / 3'-PyCACTGNNNCG-5'^[38]。在小鼠 *GST-Ya* 亚基基因中, 发现有类似于大鼠 *GST-Ya* 基因中 ARE 的亲电试剂反应元件 EpRE (Electrophile responsive element)^[39-41]。EpRE 含有与 ARE 相同的核心序列。

鱼类 *GST* 基因 5' 侧翼区调控元件的研究不如哺乳类清楚。Leaver^[42,43]对 *GSTA*、*GSTA1*、*GSTA2* 基因启动子区域序列进行比较分析发现, 比目鱼 *GSTA* 启动子区含 4 个 ARE (或 EpRE) 调控元件, *GSTA1* 启动子区含几个 PPRE (Peroxisome proliferators response element) 和 2 个 ERE (Estrogen response element) 调控元件, 而 *GSTA2* 的调控区则不含任何可识别的启动子元件, 很可能是一个假基因。对比目鱼 *GSTA*、*GSTA1* 及 *GSTA2* 启动子区进行活性分析发现, 比目鱼 *GSTA* 启动子区活性最高, *GSTA1* 次之, 而 *GSTA2* 最低。比目鱼 *GSTA* 基因的表达调控模式可能跟哺乳类 *sGST* 的 Alpha 家族相类似, 均由一系列亲电子的外源性物质通过 ARE 诱导 *GST* 的表达, 提示 *GSTA* 在鱼类及哺乳类的抗氧化应激方面可能发挥着相似的作用。与哺乳类不同, 比目鱼 *GSTA1* 基因可能受雌激素和过氧化物酶体增殖物 (包括脂肪酸等) 的调控, 其生理作用尚待研究探讨。

我们已成功克隆鲤鱼、鳙鱼、罗非鱼、草鱼、鲫鱼、鲮鱼、斑鳢、鳜鱼、唐鱼等淡水鱼类 *sGST* 基因 cDNA 的核心片段, 并进行

一步获得鲢鱼、鳙鱼、罗非鱼、唐鱼等 *sGST* 基因 cDNA 全序列及 5' 侧翼调控序列。对鲢鱼、罗非鱼 *sGST* 基因侧翼区序列分析发现, 这些序列中除含有 EpRE 等哺乳类 *sGST* 普遍存在的调控元件外, 还含有 LPS 结合位点, 提示微囊藻毒素与 LPS 对 *sGST* 基因的转录表达均有潜在的调控作用, 这也进一步为我们的活体表达调控实验结果所证实。

4 研究展望

蓝藻水华暴发后, 一部分微囊藻毒素进入水生动植物体内, 诱导机体内去毒相关基因 (如 *sGST*、*GPX*、谷胱甘肽合成酶等) 转录表达加强, 这些基因的表达产物一方面缓解氧化压力、抑制活性氧对机体的损伤, 另一方面催化毒素形成亲水化合物经排泄系统排出体外; 而剩下的大部分未进入水生动植物体内的微囊藻毒素, 在自然水体中经光或水栖微生物的作用最终被降解。由于光降解和微生物降解在自然生态环境下都是缓慢进行的, 而污染造成蓝藻水华频繁地大规模地暴发, 以致水体中藻毒素的含量长时间维持在一个较高的水平上, 最终导致微囊藻毒素在自然水体中大量积聚, 影响水生生态系统的稳定, 并且威胁到人类的饮用水安全及淡水产品食用安全。

目前, 关于微囊藻毒素在水生动植物体内去毒代谢的详细研究还只停留在去毒的第一步——*sGST* 催化下微囊藻毒素与 GSH 发生的加合反应, 将体内微囊藻毒素转化成极性更高的物质, 使其毒性减弱、水溶性增加, 至于微囊藻毒素去毒代谢相关基因的精确结构, 以及这些基因的顺式元件及反式因子的作用机理尚不清楚。我们对中国主要淡水养殖鱼类 *sGST* 基因研究表明, 这些鱼类肝脏 *sGST* 基因 mRNA 表达水平与其对微囊藻毒素耐受能力存在明显相关性, 但这些鱼类肝脏 *sGST* 基因差异表达的机理尚待探明。另外, 目前有关淡水鱼类 *sGST* 基因对微囊藻毒素去毒作用的研究主要以 MG-LR 为代表, 但淡水鱼类 *sGST* 对于不同类型微囊藻毒素 (例如 MG-YR、MG-RR 等) 是否具有相同的去毒作用也有待进一步研究。

致谢:

本文承蒙中国科学院水生生物研究所刘建康院士指导, 特此致谢。

参考文献:

- [1] Tang Z Y, Yu Y Q. Primary Liver Cancer [M]. Shanghai: Scientific and Technical Press. 1989, 30-37 [汤钊猷, 余业勤. 原发性肝癌. 上海: 科学技术出版社. 1989, 30-37]
- [2] Sivonen K, Niemela S I, Lipistö L, et al. Toxic cyanobacterial blue green algae in finnish fresh and coastal waters [J]. *Hydrobiologia*, 1990, 190: 267-275
- [3] Hu Z Q, Liu Y D. Accumulation of microcystin-RR in *Synechococcus elongatus* and its toxic effects [J]. *China Environmental Science*, 2005, 25(1): 23-27 [胡智泉, 刘永定. 微囊藻毒素在细长聚球藻中的积累及其毒性效应. 中国环境科学, 2005, 25(1): 23-27]

- [4] Pires L M, Karlsson K M, Meriluoto J A, et al. Assimilation and depuration of microcystin-LR by the zebra mussel, *Dreissena polymorpha* [J]. *Aquatic Toxicology*, 2004, **69**: 385—396
- [5] He J Y, He Z R, Guo Q L. The toxicity of microcystis aeruginosa to fishes and daphnia [J]. *Journal of Lake Science*, 1997, **9**(1): 49—56 [何家苑, 何振荣, 郭琼林. 有毒铜绿微囊藻对鱼和溞的毒性. 湖泊科学, 1997, **9**(1): 49—56]
- [6] Liu J K, Xie P. Direct control of microcystis bloom through the use of Planktivorous Carp closure experiments and lake fishery practice [J]. *Ecolagric Science*, 2003, **22**(3): 193—196 [刘建康, 谢平. 用鲢鳙直接控制微囊藻水华的围隔试验和湖泊实践. 生态科学, 2003, **22**(3): 193—196]
- [7] Xie P, Liu JK. Practical success of biomanipulation using filter-feeding fish to control cyanobacteria blooms: a synthesis of decades of research and application in a subtropical hypereutrophic lake [J]. *Scientific World Journal*, 2001, **1**: 337—356
- [8] Datta S, Jana B B. Control of bloom in a tropical lake: grazing efficiency of some herbivorous fishes [J]. *Fish Biol*, 1998, **53**(1): 12—24
- [9] Pfugmacher S, Wiegand C, Oberemm A, et al. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxification [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, **1425**(3): 527—533
- [10] Beattie K A, Ressler J, Wiegand C, et al. Comparative effects and metabolism of two microcystins and nodularin in the brine shrimp *Artemia salina* [J]. *Aquatic Toxicology*, 2003, **62**: 219—226
- [11] Best J H, Pfugmacher S, Wiegand C, et al. Effects of enteric bacterial and cyanobacterial lipopolysaccharides, and of microcystin-LR, on glutathione S-transferase activities in zebra fish (*Danio rerio*) [J]. *Aquat Toxicol*, 2002, **60**(3—4): 223—231
- [12] Gehring M M, Shephard E G, Downing T G, et al. An investigation into the detoxification of microcystin-LR by the glutathione pathway in Balb/c mice [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, **36**(5): 931—941
- [13] Gehring M M, Downs K S, Downing T G, et al. An investigation into the effect of selenium supplementation on microcystin hepatotoxicity [J]. *Toxicology*, 2003, **41**(4): 451—458
- [14] Pinho G L, da Rosa C M, Maciel F E, et al. Antioxidant responses after microcystin exposure in gills of an estuarine crab species pretreated with vitamin E [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2005, **61**(3): 361—365
- [15] Liang X F, Lin X T, Huang F, et al. The liver uncoupling protein 2 gene of the red sea bream (*Pagrus major*) with reference to its physiological function [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2003, **49**(1): 110—117 [梁旭方, 林小涛, 黄芬, 等. 真鲷肝脏解偶联蛋白2(UCP2)基因及其功能的探讨. 动物学报, 2003, **49**(1): 110—117]
- [16] Liang X F, Ogata H Y, Oku H, et al. Abundant and constant expression of uncoupling protein 2 in the liver of red sea bream *Pagrus major* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 2003, **136**(3): 655—661
- [17] Shephard G S, Stockenstrom S, Villiers D, et al. Photocatalytic *on*, 1998, **36**(12): 1895—1901
- [18] Shephard G S, Stockenstrom S, de Villiers D, et al. Degradation of microcystin toxins in a falling film photocatalytic reactor with immobilized titanium dioxide catalyst [J]. *Wat. Res.*, 2002, **36**: 140—146
- [19] Takenaka S, Watanabe M F. Microcystin LR degradation by *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease [J]. *Chemosphere*, 1997, **34**(4): 749—757
- [20] Park H D, Sasaki Y, Manuyama T, et al. Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by a new bacterium isolated from a hypertrophic lake [J]. *Environ Toxicol*, 2001, **16**(4): 337—343
- [21] Yan H, Pan G, Zhang M M. Advances in the study of microcystin toxin [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2002, **22**(11): 1968—1975 [闫海, 潘纲, 张明明, 等. 微囊藻毒素研究进展. 生态学报, 2002, **22**(11): 1968—1975]
- [22] Boume D G, Jones G J, Blakeley R L, et al. Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin LR [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**(11): 4086—4094
- [23] Bourne D G, Riddles P, Jones G J, et al. Characterization of a gene cluster involved in bacterial degradation of the cyanobacterial toxin microcystin LR [J]. *Environ Toxicol*, 2001, **16**(6): 523—534
- [24] Saito T, Okano K, Park HD, et al. Detection and sequencing of the microcystin LR-degrading gene, *mlrA*, from new bacteria isolated from Japanese lakes [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2003, **229**(2): 271—276
- [25] Lu X W, Inamori Y H, Ding G J. Degradation of *Microcystis viridis* and microcystins with biological reactors [J]. *China Environmental Science*, 1999, **9**(2): 138—140 [吕锡武, 稻森悠平, 丁国际. 有毒蓝藻及藻毒素生物降解的初步研究. 中国环境科学, 1999, **9**(2): 138—140]
- [26] AO H Y, Shen Y W, Qiu C Q, et al. Biodegradation of algal powder of toxic cyanobacteria from Dianchi lake [J]. *Resources and Environment in the Yangtze Basin* Jan, 2002, **1**(1): 43—46 [熬鸿毅, 沈银武, 丘昌强, 等. 滇池水华蓝藻干粉制剂的生物脱毒实验. 长江流域资源与环境, 2002, **1**(1): 43—46]
- [27] Choi S H, Kim S G. Lipopolysaccharide inhibition of rat hepatic microsomal epoxide hydrolase and glutathione S-transferase gene expression irrespective of nuclear factor-kappaB activation [J]. *Biochem Pharmacol*, 1998, **56**(11): 1427—1436
- [28] Best J H, Eddy F B, Codd G A. Effects of *Microcystis* cells, cell extracts and lipopolysaccharide on drinking and liver function in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss Walbaum* [J]. *Aquat Toxicol*, 2003, **64**(4): 419—426
- [29] Rushmore T H, Pickett C B. Glutathione S-transferases, structure, regulation, and therapeutic implications [J]. *J Biol Chem*, 1993, **268**(16): 11475—11478
- [30] Rushmore T H, King R G, Paulson K E, et al. Regulation of glutathione S-transferase Ya subunit gene expression: identification of a unique xenobiotic responsive element controlling inducible expression by planar aromatic compounds [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990,

- [31] Paulson K E, Damell J E Jr, Rushmore T, et al. Analysis of the upstream elements of the xenobiotic compound-inducible and positionally regulated glutathione S-transferase Ya gene [J]. *Mol Cell Biol*, 1990, **10**(5): 1841—1852
- [32] Denison M S, Fisher J M, and Whitlock J P Jr. Protein-DNA interactions at recognition sites for the dioxin-Ah receptor complex [J]. *J Biol Chem*, 1989, **264**(28): 16478—16482
- [33] Fujisawa-Sehara A, Yamane M, Fuji-Kuriyama Y. A DNA-binding factor specific for xenobiotic responsive elements of P-450c gene exists as a cryptic form in cytoplasm: its possible translocation to nucleus [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85**(16): 5859—5863
- [34] Denison M S, Fisher J M, Whitlock J P Jr. Inducible, receptor-dependent protein-DNA interactions at a dioxin-responsive transcriptional enhancer [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85**(8): 2528—2532
- [35] Neuhold L A, Shirayoshi Y, Ozato K. Regulation of mouse CYP1A1 gene expression by dioxin: requirement of two cis acting elements during induction [J]. *Mol Cell Biol*, 1989, **9**(6): 2378—2386
- [36] Whitlock J P Jr. The regulation of gene expression by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin [J]. *Pharmacol Rev*, 1987, **39**(2): 147—161
- [37] Rushmore T H, Pickett C B. Transcriptional regulation of the rat glutathione S-transferase Ya subunit gene. Characterization of a xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by phenolic antioxidants [J]. *J Biol Chem*, 1990, **265**(24): 14648—14653
- [38] Rushmore T H, Morton M R, Pickett C B. The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity [J]. *J Biol Chem*, 1991, **266**(18): 11632—11639
- [39] Rozen F, Nguyen T, Pickett C B. Isolation and characterization of a human glutathione S-transferase Ha1 subunit gene [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1992, **292**: 589—593
- [40] Rohrdanz E, Nguyen T, Pickett C B. Isolation and characterization of the human glutathione S-transferase A2 subunit gene [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1992, **298**: 667—677
- [41] Klone A, Hussnatter R, Seis H. Cloning, sequencing and characterization of the human alpha glutathione S-transferase gene corresponding to the cDNA clone pGTH2 [J]. *Biochem J*, 1992, **285**: 925—928
- [42] Leaver M J, George S G. Three repeated glutathione S-transferase genes from a marine fish, the Plaice (*Pleuronectes platessa*) [J]. *Marine Environmental Research*, 1996, **42**(1—4): 19—23
- [43] Leaver M J, George S G. Structure of the plaice glutathione S-transferase a gene [J]. *Marine Environmental Research*, 1995, **39**(1—4): 33—37
- [44] Liao W Q, Liang X F, Wang L, et al. Cloning of the microcystin-detoxifying gene in the main Chinese freshwater fishes [J]. *Ecologic Science*, 2005, **24**(2): 6—8 [廖婉琴, 梁旭方, 王琳, 等. 淡水鱼类微囊藻毒素去毒酶基因的克隆. 生态科学, 2005, **24**(2): 6—8]