



## 微囊藻毒素 LR 对草鱼肝脏超微结构影响的研究\*

周炳升 徐立红 张甬元 徐 盈

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

### THE EFFECT OF MICROCYSTIN-LR ON THE LIVER ULTRASTRUCTURE OF GRASS CARP, *CTENOPHARYNGODON IDELLUS*

Zhou Bingsheng, Xu Lihong, Zhang Yongyuan and Xu Ying

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

**关键词** 微囊藻毒素 LR, 肝脏, 超微结构, 草鱼

**Key words** Microcystin-LR, Liver, Ultrastructure, *Ctenopharyngodon idellus*

关于微囊藻毒素对哺乳动物的影响已有较多的研究,指出微囊藻毒素 LR 是一种作用于肝脏的极强环肽毒素,并能引起肝细胞超微结构的改变<sup>[1]</sup>,但是有关该毒素对鱼类影响的报道却很少,作者采用腹腔注射微囊藻毒素的方法,确定其在鱼体内作用的靶器官,观察超微结构的组织病理变化,并与对哺乳动物作用的结果相比较,进而探讨其对鱼类的致毒机理。

#### 1 材料和方法

微囊藻毒素 LR 由日本名城大学药学部提供。

实验鱼为草鱼 [*Ctenopharyngodon idellus*], 体重 31—38g, 体长 11—13cm, 取自中国科学院水生生物研究所养殖场, 在 25℃ 下通以循环水驯化 1 周。将藻毒素溶于蒸馏水中, 实验组每尾鱼注射剂量为 900μg / kg (0.2ml), 对照组则注射 0.2ml 蒸馏水, 分别在 0.25、0.5、1、3、6、24h 取样, 将肝、肾、心和鳃组织先固定于 2.5% 戊二醛固定液中, 按常规电镜超薄切片技术制样, 在 H-300 型电子显微镜下观察照相。

#### 2 结果与讨论

**2.1** 在实验期间无鱼死亡。超微结构观察显示, 注射蒸馏水的对照组, 无任何病理变化, 肝细胞有较多的线粒体, 池状内质网分布在细胞核周围。含有丰富微绒毛的胆小管存在于相邻的肝细胞膜之间 [图版 I: 1]。

**2.2** 实验组在 0.25h 时, 肝细胞除有少量细胞质丢失外无任何显著变化。

**0.5h** 肝细胞膜之间开始变宽, 因而形成了增大的细胞间隙, 可观察到大量脂滴, 有一些粗面内质网

\* 国家自然科学基金资助 (39370151)

1994-04-21收到。修改稿 1997-06-10收到。

已开始片段化。

**1h** 许多肝细胞相互解离,形成了许多游离和成群的肝细胞,同时可观察到细胞变圆,并可观察到大的非细胞空间[图版 I: 2]。胆小管出现在细胞质中,细胞索的结构损坏。

**3h** 大量肝细胞进一步解离,在一些区域,观察到在非细胞空间有大量血细胞,即肝出血[图版 I: 3]。细胞内粗面内质网变成了小泡,也观察到环状粗面内质网及增生的滑面内质网。有的游离细胞的一端出现电子比较致密的突出结构。

**6h** 其最显著的变化是在细胞之间出现了丰富的微丝,这些微丝排列不规则[图版 I: 4]许多肝细胞质中形成了不同大小的由膜包裹的小泡,这些小泡由浓聚的线粒体和粗内质网小泡组成。一些肝细胞开始崩解,肝细胞边缘已难以分辨。

**24h** 其显著变化是肝细胞核的改变,包括核形状异常,核膜扩张及崩解,细胞核浓缩,细胞核和核仁肥大,有时可观察到崩解的细胞核和核仁[图版 I: 5]。同时,整个肝细胞发生严重病变,几乎所有的肝细胞被损坏,在低倍下肝脏呈网状结构,肝细胞膜已损坏破裂,肝细胞则变成了许多不同大小的膜包围的小泡[图版 I: 6],这些小泡由浓聚的圆形线粒体,粗面内质网小泡和聚缩的高尔基体组成。有时可观察到在肝细胞一端有微丝,但肝细胞之间的微丝已消失。

将肾、心和鳃同样置于电镜下观察,在6h之前,没有显著变化,在24h,鳃丝保持完整,但所有上皮细胞,柱细胞、氯细胞已死亡,在血管中无红细胞,这与肝脏大量充血有关,在心脏样品中可观察到心肌细胞之间的腔隙变大,肾脏则无显著变化。

以上观察表明,微囊藻毒素LR对草鱼作用的靶器官为肝脏,在哺乳动物中,微囊藻毒素LR引起的毒性是使肝细胞很快变圆,然后是大面积的肝内出血,并使动物急性死亡<sup>[2]</sup>,因此,微囊藻毒素LR对鱼类的作用与对哺乳动物作用的靶器官是一致的。同时也显示,微囊藻毒素LR导致草鱼肝脏超微结构发生的最显著变化是肝细胞解离并形成非细胞空间,出现微丝,肝充血和肝细胞坏死,这与对哺乳动物肝脏的作用也基本相似。本研究首次证实了毒素LR对草鱼肝脏的作用与其对哺乳动物肝脏作用相类似。表明藻毒素对哺乳动物和鱼类有相同或相似的致毒机制。特别值得注意的是,藻毒素引起肝脏早期的改变是肝细胞的解离并出现微丝,这说明藻毒素首先作用的部位可能是细胞之间的联结。微囊藻毒素处理的体外培养小鼠肝细胞也显示,其首先影响的是细胞间联结,这表明,藻毒素对肝细胞体内外作用位点一致。另外需要指出的是细胞核改变,在哺乳动物中没有报道,这可能与作用时间及处理剂量不同有关,用同样剂量处理大小鼠肝细胞15min时即开始分离,然后在几小时即导致死亡<sup>[2]</sup>,因此就其对毒素敏感程度而言,哺乳动物更敏感。但也显示,毒素首先影响胞器,然后是胞核,已有报道指出,微囊藻毒素有强的促肿瘤形成作用<sup>[4]</sup>,因此,有必要进一步证实这些种类细胞核的变化,是否与该毒素能引起鱼类肝脏产生肿瘤,即是否有致癌作用有关。

在实验早期,可观察到较多增生的滑面内质网,可能与细胞解毒作用有关,因为滑面内质网的重要功能之一就是参与细胞解毒,而肝脏是机体内最重要的解毒器官,这也表明在实验早期,肝细胞仍具有生命活力,这种变化在哺乳动物实验中也已有报道<sup>[3]</sup>。电镜观察结果表明了藻毒素LR对鱼肝超微结构的其它影响,包括粗面内质网的片段化和形成小泡,核糖体脱颗粒和线粒体浓聚等,这些种类的胞器损伤在大鼠和小鼠实验中也有报道<sup>[2,3]</sup>。在细胞质中观察到的脂滴增加可能是毒素影响了细胞的脂代谢。此外,胆小管的损坏,表明肝细胞分泌胆汁的功能已破坏。

总之,从超微结构的组织病理方面比较,微囊藻毒素LR对草鱼的影响和哺乳动物有许多相似之处,受影响最显著的器官是肝脏而不是其它器官。作者认为首先被作用的是肝细胞之间的联结,因为在实验早期,肝细胞开始分离,并可引起肝内出血,因此,微囊藻毒素LR对微丝或细胞膜的分子作用机制需要通过生物化学或分子生物学的方法作更进一步的研究。

## 参 考 文 献

- [1] Carmical W. W, Jones, C. L. A., Mahmood N. A., et al. Algal toxins and water-based diseases. *Crit. Rev. Environ. Cont.*, 1985, 15: 275—313

[2] Hooser S B, Beasley, V. R., Lovell, R. A., et al. Toxicity of microcystin-LR, a cyclic heptapeptide hepatotoxia from microcystis aeruginosa to rats and mice. *Vet. Pathol.*,1989, **26**: 246—252

[3] Raberg C M Bylund I, G, Eriksson. J. E. Histopathological effects of microcystin-LR, a cyclic peptide toxin from the cyanobacterium (blue-green alga). *Aquatic toxicology*, 1991, **20**: 131—146

[4] Nie Nishiwaki-Matsushima, Tetsuya Ohta, Shinji Nishiwaki, Masami Suganuma, Kiyomi Kohyama, Takatoshi Ishikawa, Wayne W. Carmichael, and Hirota Fujiki. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1992, **118**: 420—424

.....

图 版 说 明

图 版 I

1. 对照草鱼肝细胞超微结构,  $\times 4,000$ ; 2. 注射微囊藻毒素 LR(剂量  $900\mu\text{g} / \text{kg}$ ) 1h 后的肝, 肝细胞相互分离并形成大的非细胞空间(★), 肝细胞结构索被损坏,  $\times 3000$ ; 3. 注射毒素(剂量  $900\mu\text{g} / \text{kg}$ ) 3h 后的肝, 在细胞间隙可见大量聚集的血细胞(箭头),  $\times 3000$ ; 4. 注射毒素(剂量  $900\mu\text{g} / \text{kg}$ ) 6h 后的肝, 在肝细胞间隙有丰富的微丝(MF),  $\times 7000$ ; 5. 注射毒素(剂量  $900\mu\text{g} / \text{kg}$ ) 24h 后的肝, 三个崩解的细胞, 示细胞核(N)及核仁病变,  $\times 5000$ ; 6. 注射毒素(剂量  $900\mu\text{g} / \text{kg}$ ) 24h 后的肝, 低倍电镜图像, 示肝细胞崩解状,  $\times 5000$

1. Ultrastructure of a normal hepatocyte from a control grass carp,  $\times 4,000$ ; 2. 1h after-injection of microcystin-LR. Hepatocytes separated from each other, forming en-larged non-cell spaces (★) and the liver structures was damaged.  $\times 3,000$ ; 3. 3h after-injection. Hepatocytes separated with a clog of blood cell accumulation occurring in the spaces (arrowed).  $\times 3,000$ ; 4. 6h after-injection. Abundant microfilaments observed in the intercellular spaces, rough endoplsmic reticulum fragmented.  $\times 7,000$ . MF, microfilament; 5. 24h after-injection. Three degenerated hepatocytes, showing a dissolved nucleus with electron-dense structure (arrowed) and two pycnotic nuclei with dispersed nucleous or nucleus (N).  $\times 5,000$ ; 6. 24h after-injection. A portion of electron micrograph of the liver ultrastructure, showing dissolved hepatocytes.  $\times 5,000$

