

微囊藻毒素在鲤鱼体内生物富集作用的初步研究

徐海滨¹ 隋海霞¹ 高士荣² 严卫星¹

(1. 中国疾控中心营养与食品安全所,北京 100021;

2. 中国疾控中心环境与健康相关产品安全所,北京 100021)

摘要:为了解微囊藻毒素在鲤鱼体内生物富集作用,用 ELISA 法对饲养不同时间的鲤鱼肝脏和肌肉以及饲养用水中的微囊藻毒素进行测定。结果显示,鲤鱼肝脏和肌肉的微囊藻毒素含量在试验第七天达到峰值,分别为 1.43 ng/g 和 2.53 ng/g。饲养用水微囊藻毒素在第四天达到 11.36 ng/g,是整个试验期间的最高值。不同时间鲤鱼肝脏对微囊藻毒素的生物富集能力均明显高于肌肉,鲤鱼肝脏的生物富集系数在实验第三十五天达到 3 961.6,为整个试验的最高值,肌肉的生物富集系数在试验开始后 28 d 内平缓上升,维持在 800 左右,整个试验期间肝脏的生物富集系数基本是肌肉的 3.9 倍。本研究为囊藻毒素对水产品的污染和制定其在水产品中的限量标准提供了依据。

关键词:藻类;富营养化;微囊藻毒素;鲤鱼

Primary experimental study on bioaccumulation of microcystin in *Cyprinus Carpio*

Xu Haibin, et al.

(National Institute for Nutrition and Food Safety, China CDC, Beijing 100021)

Abstract: In order to investigate bioaccumulation effect of microcystin in *Cyprinus Carpio*, level of microcystin in liver and muscle of *Cyprinus Carpio* as well as water sample, were examined by ELISA. The results showed that levels of microcystin in liver and muscle samples reached the highest of 1.43 ng/g and 2.53 ng/g, respectively at day 7, and in water at day 4, 11.36 ng/g. Bioaccumulation capability of liver was remarkably higher and 3.9 times of muscle at different times and the bioaccumulation coefficient reached the maximum of 3 961.6 at day 35 while the bioaccumulation coefficient of muscle increased gradually from the beginning of experiment and maintained about 800 until the end of experiment. The results of this study provide the scientific base for establishing the Tolerance limit of microcystin in aquaculture products.

Key Words: Algae; Eutrophication; Microcystin; Carp

我国的一些湖泊近年来水体富营养化日趋严重,浮游藻类大量繁殖,不仅使水体感官性状恶化,而且由于藻细胞腐败裂解后微囊藻毒素被释放到水中,野生动物及家畜家禽饮用了含有产毒藻及藻毒素的水后,发生中毒甚至死亡。^[1]淡水鱼类是重要的食物资源,微囊藻毒素对水生生物体的污染而引起潜在的健康危害已成为一个重要的公共卫生问题。自然水体中水生生物富集微囊藻毒素已有一些资料,^[2-3]但尚未见实验室条件下在鲤鱼体内微囊藻毒素生物富集研究的国内外报道。本研究在实验室

条件下建立了鱼体富集微囊藻毒素的模型,并对其在鱼体内的生物富集规律进行了初步研究,为探讨微囊藻毒素对水产品的污染和制定其在水产品中的限量标准提供依据。

1 材料和方法

1.1 微囊藻毒素样品制备和鉴定

取太湖水华期鲜藻,镜检含有大量产毒微囊藻。鲜藻经 12 000 r/min,离心 10 min,冷冻真空干燥机冷冻干燥,得干藻粉,分装于试管中,密闭, - 20 ℃

作者简介:卫生部科学研究基金资助(98-1-067)

作者简介:徐海滨 男 博士 副研究员

This work was supported by the grant from Science Research Funds of Ministry of Health, China. (98-1-067)

冻保存备用。HPLC 检测干藻粉含微囊藻毒素 0.44 mg/g, 主要为 MC-LR 和 MC-RR。

试验前, 将 9 g 干藻粉溶于 900 mL 养鱼水中(该水取自鱼缸), 超声振荡 5 min 后, 使藻细胞完全破碎, 得微囊藻粗提水溶液。取体重 25~30 g 的健康雄性小鼠 10 只, 腹腔注射 1 mL 微囊藻粗提液(4.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 注射后 15~30 min 后 7 只小鼠出现昏睡、抽搐, 在 1~2 h 内死亡, 解剖见肝脏充血肿大, 质脆, HE 染色肝窦内白细胞浸润, 肝细胞灶性坏死, 呈典型微囊藻毒素中毒肝脏病理相, 证实所得粗提液含有微囊藻毒素。

1.2 试验鱼种和饲养条件

试验鱼种选鲤鱼, 购于北京水产研究所, 平均体长 9.5~10.0 cm, 平均体重 50 g/尾, 行动活泼、体色光泽、鱼鳍完整舒展、逆水性强、食欲好。在实验室内驯养一周后进行试验。鱼饵料购于北京水产研究所, 投食前经 ELISA 测定, 不含微囊藻毒素。试验容器采用玻璃缸, 其盛水量以每条鱼约 2 L 水为宜, 放置 3 d 以上的自来水作为饲养用水。经水质分析, 饲养用水的 pH 值、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 K^{+} 、溶解氧均符合地面水质要求。

1.3 试验步骤

随机将 96 尾鲤鱼分为试验组和空白对照组。试验组又分成相同剂量的 6 个小组, 每小组 12 尾鱼, 投放一个鱼缸内, 每个鱼缸一次性投放 9 g 干藻粉粗提水溶液。在试验的第四天和第七天, 从试验组每个鱼缸中各取鱼 1 尾, 水样 50 mL 作为检测样。以后每七天各缸重复取鱼 1 尾, 水样 50 mL, 试验持续 77 d, 整个试验期间共取鱼样、水样各 12 次。空白对照组的 24 尾鲤鱼分为 4 个小组, 每六尾鱼放在一个鱼缸内。每取 3 次实验组鱼样, 取一个对照组的鱼样和水样。各组鲤鱼处死后取背部肌肉和肝脏测定微囊藻毒素含量。

1.4 微囊藻毒素的测定

称取鱼肌肉和肝脏试样各 1 g, 经丁醇 + 甲醇 + 水(5 + 25 + 70, 体积分数)抽提, 12 000 r/min 离心 10 min, Sep-Pak C18 小柱过滤, 依次用酸化水(pH 5.0)、20%和 80%甲醇梯度洗脱, 真空冷冻干燥机冷冻至干, 0.01 mol/mL PBS 溶解, 小管分装。水样在 -80 反复冻融 3 次, 经玻璃纤维滤膜(Whatman GF/C)过滤, 取中间的 1 mL 水样待测。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)方法测定试样中微囊藻毒素含量。^[4]

2 结果与分析

2.1 微囊藻毒素在鲤鱼肌肉、肝脏和饲养用水中的

动态变化

微囊藻毒素在鲤鱼肌肉、肝脏和饲养用水中的含量的动态变化见图 1。给饲养鱼缸内投放微囊藻毒素, 水样微囊藻毒素在第四天达到 11.36 ng/g, 是整个试验期间的最高值。实验组鲤鱼肌肉、肝脏的微囊藻毒素含量高峰出现时间略滞后于饲养用水, 至第七天达到峰值, 分别为 1.43 ng/g 和 2.53 ng/g。试验期间各时间点肝脏的微囊藻毒素含量均显著高于肌肉和水样中的含量。在试验的第二十八天, 肌肉的微囊藻毒素含量接近同一时间的饲养用水。对照组鲤鱼肌肉和肝脏的微囊藻毒素含量在整个试验期间波动很小, 分别在 0.55 ng/g 和 0.36 ng/g 上下波动, 对照组的水样微囊藻毒素含量极微, 平均只有 0.46 pg/mL, 是饲养用水(平均 0.46 ng/mL)的千分之一。

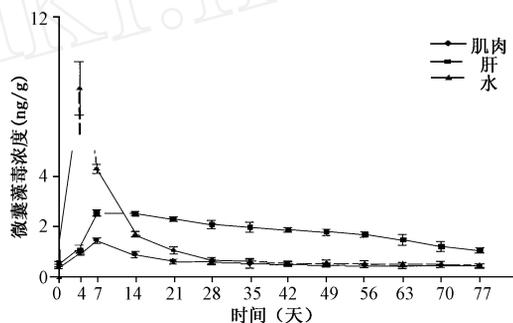


图 1 实验组鱼肌肉、鱼肝脏和实验用水微囊藻毒素含量动态变化

2.2 微囊藻毒素在鲤鱼肌肉和肝脏中的富集作用

微囊藻毒素的生物富集作用可以用微囊藻毒素在鲤鱼组织和同期饲养用水样的含量比值大小来表示, 不同采样时间鲤鱼肌肉和肝脏生物富集系数的变化见图 2。由图 2 可见, 不同时间鲤鱼肝脏对微囊藻毒素的生物富集能力均明显高于肌肉, 鲤鱼肝脏的生物富集系数在实验第三十五天达到 3 961.6, 为试验的最高值, 之后呈波动下降趋势, 试验结束时仍维持在 2 500 左右; 肌肉的生物富集系数在试验开始后 28 d 内平缓上升, 28 d 后维持在 800 附近, 整个试验期间肝脏的生物富集系数基本是肌肉的 3.9 倍。

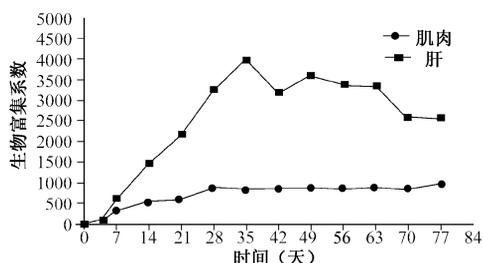


图 2 不同时间鲤鱼微囊藻毒素的生物富集系数的动态变化

3 讨论

蓝藻是淡水鱼类、特别是鲤鱼的饵料之一。鱼类通常经口接触微囊藻毒素。人类作为生物链的最高级别,食物中微量的有害物质都可以通过食物链浓缩富集,进入人体内对人类健康造成危害。由于生物样品中微囊藻毒素测定较为困难,进行微囊藻毒素室内生物富集研究的资料很少。ELISA 测定水样微囊藻毒素的灵敏度是 50~1 000 pg/mL。^[5]本研究建立了单克隆抗体的 ELISA 方法检测肌肉和肝脏微囊藻毒素的方法,肝脏样品微囊藻毒素的相对平均回收率是 78.7%,范围为 61.5%~96.1%,相对标准差为 11.5%,鱼肉样品微囊藻毒素的相对平均回收率为 72.5%,范围为 62.5%~89.2%,相对标准差为 12.3%,达到了研究的要求。

微囊藻毒素通过胆汁酸转运系统进入肝脏中,^[6]肝脏是体内最大的代谢解毒器官,从多种途径进入体内的外源性化学物,大多数都在肝内转化或贮存。肝脏中的微囊藻毒素全部结合于肝细胞液组分中,绝大部分以共价形式结合,^[7]通过作用于肝脏的 PP1(蛋白磷酸酶 1)和 PP2A(蛋白磷酸酶 2A)发挥其主要毒性作用。Ito E^[8]等给予大鼠一次注射染毒微囊藻毒素 14 d 后,只有少量微囊藻毒素存在于胃肠粘膜上皮细胞中,大部分微囊藻毒素通过粪便排出体外。本研究中饲养用水一次性加入微囊藻毒素后,微囊藻毒素迅速在鲤鱼组织中富集,微囊藻毒素在肌肉和肝脏中达到最高峰的时间是试验的第七天,此后组织内微囊藻毒素的含量逐步下降,在实验的第二十八天,肌肉的微囊藻毒素含量接近同一时间的饲养用水,但肝脏中微囊藻毒素含量始终高于肌肉中的含量,提示肝脏对微囊藻毒素的亲合力要远远高于肌肉对微囊藻毒素的亲合力,这可能与大鼠和鲤鱼对微囊藻毒素的代谢以及大鼠和鲤鱼的生活环境不同有关。本文肝脏中微囊藻毒素含量要明显高于肌肉微囊藻毒素含量的结果与有关文献一致。^[9]

本研究肝脏微囊藻毒素生物富集系数在实验的第三十五天即达到最高值 3 961.64,肌肉的生物富集系数在实验第二十八天趋于平衡。鲤鱼通过吸收、吸附、吞食等过程,从水中浓缩微囊藻毒素,在这种生物积累过程中,微囊藻毒素不断进入鲤鱼体内

又不断从体内排除,这种物质交换过程要经历一定时间才能达到动态平衡过程。肝脏和肌肉属于不同的器官,对微囊藻毒素达到平衡所需要的时间,可能有很大的差别。鲤鱼通过肝肠循环重吸收微囊藻毒素等是造成肝脏和肌肉对微囊藻毒素的富集高峰差异的原因。影响微囊藻毒素富集的因素很多,生物种的特性、微囊藻毒素的性质、微囊藻毒素的浓度和作用时间以及环境特点是影响生物富集的因素。进一步的影响因素,尚待深入研究。

参考文献:

- [1] Bischoff K. The toxicology of microcystin-LR: occurrence, toxicokinetics, toxicodynamics, diagnosis and treatment [J]. *Vet Hum Toxicol*, 2001, 43(5):294-297.
- [2] Valeria FDM, Ruquel MS, Sandra MFD. Azevedo Microcystin contamination in fish from the Jacarepagua Lagoon (Kode Janeiro, Brazil): ecological implication and human health [J]. *Toxicon*, 2001, 39:1077-1085.
- [3] Williams PE, Dawe SC, Ent ML, et al. Bioaccumulation and clearance of microcystin from salt water mussel *mytilus edulis* and in vivo evidence for covalently bound microcystins in mussel tissues [J]. *Toxicon*, 1997, 35:1617-1625
- [4] Nagata S, Ueno Y. Direct determination of microcystin in environmental freshwater by an enzyme-linked immunosorbent assay based on monoclonal antibody [J]. *Jpn J Toxicol Environ Health*, 1995, 41.
- [5] 徐均康,王红兵,朱惠刚. 蓝藻毒素及其检测方法的研究进展 [J]. *上海环境科学*, 1996, 15(9):38-40
- [6] Yoshida T. Immunohistochemical localization of microcystin LR in the liver of mice. A study on the pathogenesis of microcystin LR induced hepatotoxicity [J]. *Toxicol Pathol*, 1998, 26(3):411-418.
- [7] 晏晓容,周志军. 藻类肝毒素毒理学研究进展 [J]. *国外医学卫生学分册*, 1999, 36(4):230-234.
- [8] Ito E, Kondo F, Hara da K. Intratracheal administration of Microcystin-LR. And its distribution [J]. *Toxicon*, 2001, 39(2-3):265-271.
- [9] Ding WX. Cyanobacteria cause mitochondria membrane potential alterations and reactive oxygen species formation in primary cultured rat hepatocytes *Environ [J]. Health Perspect*, 1998, 106:409.

[收稿日期:2003-02-19]

中图分类号:R15;Q949.2 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2003)03-0202-03