

试验研究

藻毒素复合污染对鱼体的免疫毒性研究

钱利红¹, 王瑛¹, 徐佳²

(1. 煤炭科学研究总院杭州环保研究院, 浙江杭州 311201;

(2. 杭州市萧山区环境保护局, 浙江杭州 311200)

摘要: 针对水体富营养化问题, 通过单一暴露和联合暴露方式研究两种 MCs 四种暴露剂量 (0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{g/L}$) 下对鱼体的免疫毒效应。结果发现, 不同剂量 MCLR 和 MCRR 单一暴露都能使鲫鱼淋巴细胞发生死亡, 呈现明显的剂量效应和时间效应关系, 且 MCLR 对鱼体的毒性相对 MCRR 要更显著; MCLR 和 MCRR 复合暴露对鱼体淋巴细胞的毒性效应表现为协同作用, 且随着毒素浓度的增加, 其毒性效应差异显著性也随之升高, 故而鱼体的免疫系统造成重大的影响, 因此应当加强控制藻毒素在水体中的复合污染。

关键词: 微囊藻毒素; 鱼类; 复合毒性;

中图分类号: X171.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-8759(2011)06-0017-04

STUDY ON THE IMMUNE TOXICITY OF COMBINED CYANOBACTERIUM TOXINS ON FISH

QianLi-hong¹, WANG Ying¹, XU Jia²

(1. Hangzhou Environmental Protection Research Institute, CCRI, Hangzhou 311201, China;

2. Xiaoshan District Environmental Protection Bureau, Hangzhou 311200, China)

Abstract: According to the problem of water eutrophication, through comparing the poison effect on fish by the different MCs, including 0.1 $\mu\text{g/L}$, 1 $\mu\text{g/L}$, 10 $\mu\text{g/L}$ and 100 $\mu\text{g/L}$, discovered that after exposed 1 $\mu\text{g/L}$ MCLR, the mortality rate of Lymphocytes was closed to the MCRR test group; compared with the MCLR exposure group, the toxicity of the MCRR induction group was relatively weak; MCLR and MCRR have synergistic effect on fish lymphocytes. Results show that MCLR and MCRR with 0.1 $\mu\text{g/L}$ microcystins single exposed can cause the lymphocytes death, and with the increasing toxin, it will have a dose-effect relationship clearly, therefore, it may affect the fish's immune system; it will produce synergy on toxic fish if the microcystins MCLR and MCRR composite exposed. We should strengthen the control of the composite cyanobacterial toxins in the water pollution.

Keywords: microcystins; fish; Joint toxicity;

湖泊富营养化导致的蓝藻水华已成为国内外普遍关注的环境问题, 其生态风险主要来自于藻华释放的代谢产物藻毒素。微囊藻毒素 (Microcystins, MCs) 由水体中铜绿微囊藻、鱼腥藻、颤藻等蓝藻产生的由肽合成酶复合体合成的生物活性小肽, 它是细胞内毒素, 在细胞内合成, 细胞破裂

后释放出来并表现出毒性。其一般结构式为环(环 D-丙氨酸-L-X-赤- β -甲基-D-异天冬氨酸-L-Z-Adder-D-异谷氨酸-N-甲基脱氢丙氨酸), X, Z 为 2 个可变的氨基酸残基。这 2 个可变的 L-氨基酸的更替及其他氨基酸的去甲基化, 衍生出众多的毒素类型, 目前已知有七十余种不同分子构型的 MCs, 其中最普遍、毒性较大的是 MC-LR^[1]。自

1878年Nature上首次报道动物由于饮用含蓝藻的源水致死以来^[2],MCs引发的生态健康风险问题

倍受国内外关注^[3-4]。

微囊藻毒素具有水溶性,易溶于水,甲醇或丙

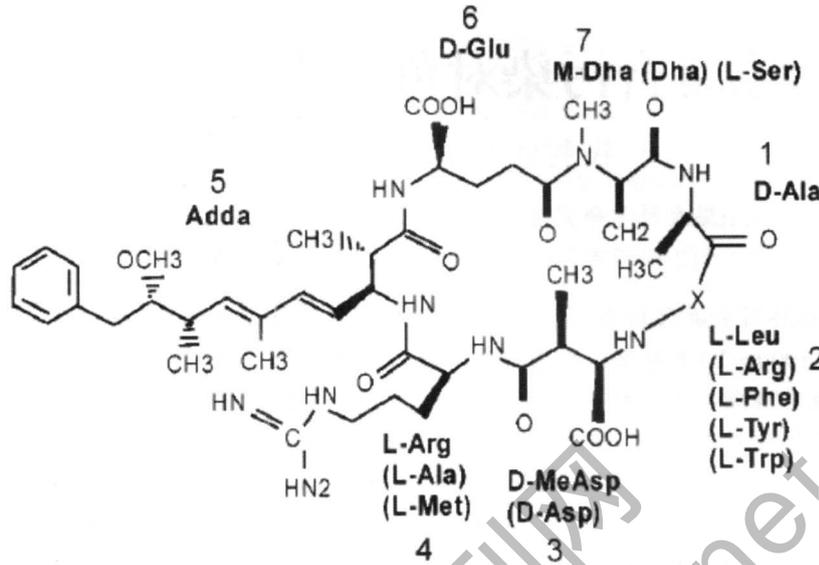


图1 微囊藻毒素的结构图

酮,不挥发,抗pH变化,化学性质相当稳定,从它的分子结构图可看出,由于其环状结构和间隔双键,它具有相当的稳定性,在水中藻毒素自然降解过程也是十分缓慢的,在去离子水中更可以保持稳定状态长达27d。此外藻毒素有很高的耐热性,加热煮沸都不能将毒素破坏,也不能将其去除;自来水处理工艺的混凝沉淀、过滤、加氯也不能将其去除,因此常规的饮水消毒处理不能完全消除水体中的藻毒素^[5]。

早期的毒理研究表明,微囊藻毒素对动物和人体的毒效应主要表现为肝毒性,肝脏是微囊藻毒素最主要的靶器官,不同剂量的MCLR能够引起肝脏急性和亚急性损伤^[6-7]。其致毒机理类似冈田酸,他们都是肝癌的强烈促癌剂,家畜及其他动物饮用了含有藻毒素的水后,会出现腹泻、乏力、厌食、呕吐等症状,严重者甚至死亡。病理病变有肝脏肿大、充血或坏死,肠炎出血、肺水肿等。近年来研究则发现,微囊藻毒素还具有免疫毒效应。研究表明,微囊藻水华样品提取物能够诱导人淋巴细胞凋亡^[8];Lankoff等(2004)^[9]报道MCLR能够引起鸡和人体外周血淋巴细胞T细胞和B细胞发生凋亡和坏死,并能够导致白细胞介素IL-6含量增加和IL-2含量减少;Yea等(2001)^[10]发现MCs能够诱导淋巴细胞功能下降,造成白细胞介素IL-2 RNA的稳定性降低,导致部分免疫反应的抑

制被调停。对免疫毒性的研究是微囊藻毒素毒理研究的热点。

由于微囊藻毒素产生于水生生态系统,而对于存在于水生生态系统中的鱼类,最容易遭受微囊藻毒素危害的生物之一。而且往往是受到多种毒素的共同作用。目前已有报道关于微囊藻毒素单一诱导细胞毒效应^[11],而对于微囊藻毒素复合污染相关报道不多见。因此,对多种微囊藻毒素对鱼体免疫系统造成的复合毒效应研究备受关注。

本实验通过比较两种微囊藻毒素MCLR和MCR及其毒素复合对鲫鱼的免疫毒效应,探讨两种微囊藻复合毒素对鱼体免疫系统的损伤,并试图对其毒性机理进行简单讨论,为MCs对鱼体免疫系统的复合毒性的致毒机理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂

MCLR(分子式:C₄₉H₇₄N₁₀O₁₂,Mr:995.2)和MCR(分子式:C₄₉H₇₅N₁₃O₁₂,Mr:1038.2)购自美国Sigma公司;FBS、RPMI1640培养基、淋巴细胞分离液购自上海生工公司。

1.1.2 试验鱼种

试验用鲫鱼购自浙江省水产研究所,平均体长25cm,平均体质量250g,行动活泼,鱼鳍完整

舒展,健康,实验室驯养 1 周后进行试验。

1.2 实验方法

1.2.1 淋巴细胞的提取

无菌室超净工作台上取鲫鱼脾脏和头肾,置于 25 ml 小烧杯中,用磷酸缓冲液(PBS)漂洗,至漂洗液近于澄清;用眼科剪将取出物剪成匀浆状,用适量 PBS 重悬,并用 200 目不锈钢网筛过滤到 50 ml 小烧杯,制备成 32 ml 待分离的细胞悬液;再取 8 根 10 ml 无菌试管,先分别加入 4 ml 淋巴细胞分离液,后沿管壁缓慢加入 4 ml 细胞悬液,注意保持上下分层的清晰界面;4 000 r/min 离心 20 min 然后小心吸取液面交界处的云雾层于另一 10ml 无菌试管中,再次 2 000 r/min 离心 10 min 去除上清液,加入适量含 10 %胎牛血清(FBS)的 RPMI1640 培养基重悬细胞,取少量于倒置显微镜下进行计数;最后将细胞接种于 96 孔板,保证细胞密度在 106 cell/ml。放置于 27 °C 生化培养箱中培养。

1.2.2 单一暴露的剂量-效应实验

MCLR、MCRR 的诱导浓度分别为 0.1、1、10、100 $\mu\text{g/L}$ 。2 种污染物均用超纯水溶解,诱导时间 6 h,每组均设 6 个重复孔,进行单一的污染物暴露的剂量-效应研究。

1.2.3 复合暴露的剂量-效应实验

试验设计浓度为:MCLR 1 $\mu\text{g/L}$ 、MCRR 1 $\mu\text{g/L}$ 、MCLR 0.5 $\mu\text{g/L}$ + MCRR 0.5 $\mu\text{g/L}$ 、MCLR 10 $\mu\text{g/L}$ 、MCRR 10 $\mu\text{g/L}$ 、MCLR 5 $\mu\text{g/L}$ + MCRR 5 $\mu\text{g/L}$ 。MCs 用超纯水溶解,诱导时间为 6 h,每组均设 6 个重复孔,进行复合污染物暴露的剂量-效应研究。

1.3 数据处理

试验以平行数据取平均值,数据以平均值 \pm 标准差表示,采用单侧 ANOVA(方差分析法)进行差异性检验。

2 实验结果

2.1 微囊藻毒素 MCLR 单独暴露的细胞毒性

由图 2 可知鲫鱼淋巴细胞在 0.1~100 $\mu\text{g/L}$ 的 MCLR 暴露 6 h 后,淋巴细胞出现明显死亡。0.1、1、10、100 $\mu\text{g/L}$ 的 MCLR 单一诱导鲫鱼淋巴细胞 6 h 后,呈现明显的剂量-效应。可以观察,1、10、100 $\mu\text{g/L}$ 试验诱导组与 0.1 $\mu\text{g/L}$ 诱导组差异极显著。0.1 $\mu\text{g/L}$ 组的死亡率不超过 5%,统计学分析

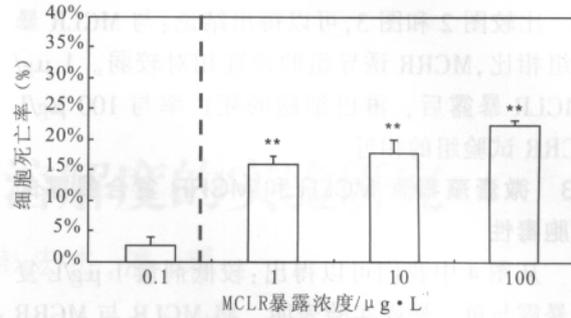


图 2 微囊藻毒素 MCLR 单独暴露的细胞毒性

无意义。100 $\mu\text{g/L}$ 的 MCLR 处理下,淋巴细胞的死亡率超过 20%,几乎为 0.1 $\mu\text{g/L}$ 组的 4 倍。

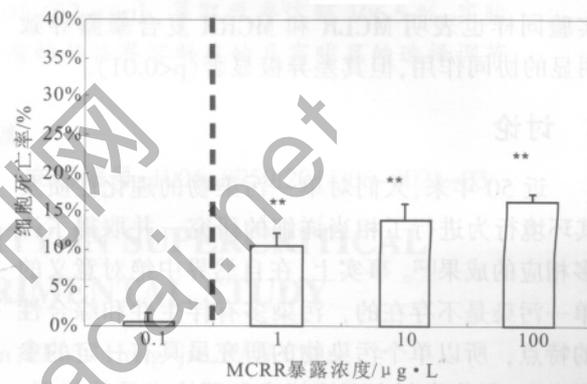


图 3 微囊藻毒素 MCRR 单独暴露的细胞毒性

2.2 微囊藻毒素 MCRR 单独暴露的细胞毒性

由图 3 可知鲫鱼淋巴细胞在 0.1~100 $\mu\text{g/L}$ 的 MCRR 暴露 6 h 后,淋巴细胞出现明显死亡。0.1、1、10、100 $\mu\text{g/L}$ 的 MCRR 单一诱导鲫鱼淋巴细胞 6 h 后,呈现明显的剂量-效应。可以观察,1、10、100 $\mu\text{g/L}$ 试验诱导组与 0.1 $\mu\text{g/L}$ 诱导组差异极显著。0.1 $\mu\text{g/L}$ 组的死亡率几乎为 0,统计学分析无意义。100 $\mu\text{g/L}$ 的 MCRR 处理下,淋巴细胞的死亡率接近 15%。

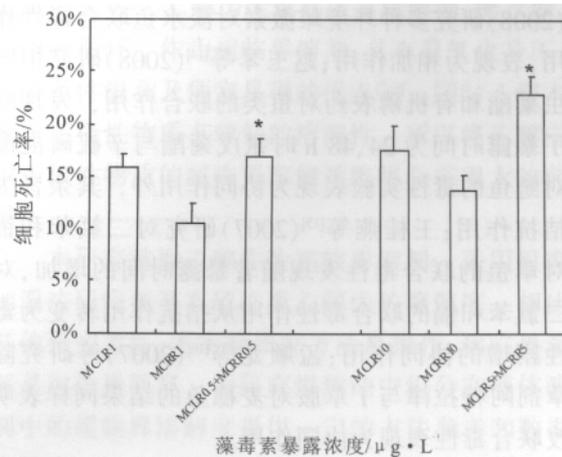


图 4 微囊藻毒素 MCLR 和 MCRR 复合暴露的细胞毒性

比较图 2 和图 3, 可以得出结论: 与 MCLR 暴露组相比, MCRR 诱导组的毒性相对较弱。1 $\mu\text{g}/\text{LMCLR}$ 暴露后, 淋巴细胞的死亡率与 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ MCRR 试验组的相近。

2.3 微囊藻毒素 MCLR 和 MCRR 复合暴露的细胞毒性

从图 4 中我们可以得出: 较低剂量 1 $\mu\text{g}/\text{L}$ 复合暴露与单一暴露实验表明, 将 MCLR 与 MCRR 复合暴露后, 与单独暴露相比较, 细胞死亡率明显上升 ($p < 0.05$), 表明 MCLR 和 MCRR 对鱼体淋巴细胞具有协同作用; 较高剂量的 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 处理组实验同样也表明 MCLR 和 MCRR 复合暴露导致明显的协同作用, 但其差异极显著 ($p < 0.01$)。

3 讨论

近 50 年来, 人们对单一污染物的理化性质及其环境行为进行了相当详细的研究, 并取得了许多相应的成果^[12]。事实上, 在自然界中绝对意义的单一污染是不存在的, 污染多有伴生性和综合性的特点, 所以单个污染物的研究虽具有一定的参考意义, 但作为制定环境标准和环境容量的依据, 就显得证据不足, 因此混合化合物对机体的联合作用越来越受到人们的重视。

鱼类是水生生态系统当中重要的组成部分, 本文研究了蓝藻释放的微囊藻毒素对鲫鱼免疫细胞的毒性效应, 结果发现 MCLR 和 MCRR 复合比单一暴露毒性更大, 且差异显著, 而且随着复合毒素剂量的增加, 复合毒素的毒性差异极显著, 说明本文研究的两种微囊藻毒素对鲫鱼淋巴细胞的损伤表现为协同作用。国内近几年相继出现了许多针对水生生态系统的联合毒性研究, 张晖等^[13] (2008) 研究多种环境雌激素对淡水鱼联合毒性作用, 表现为相加作用; 赵玉琴等^[14] (2008) 研究拟除虫菊酯和有机磷农药对鱼类的联合作用, 发现除了暴露时间为 24、48 h 时氰戊菊酯与辛硫磷混配对鲢鱼的毒性实验表现为协同作用外, 其余皆为拮抗作用; 王桂燕等^[15] (2007) 研究对二氯苯和镉对草鱼的联合毒性发现随着暴露时间的增加, 对二氯苯和镉的联合毒性作用从拮抗作用转变为毒性剧增的协同作用; 孟顺龙等^[16] (2007) 等研究除草剂阿特拉津与丁草胺对麦穗鱼的结果同样表明改联合毒性表现为协同作用。

4 结论

4.1 0.1–100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的微囊藻毒素 MCLR 和 MCRR 单独暴露均能引起鲫鱼淋巴细胞的死亡, 并且随着毒素浓度的增加而有明显的剂量-效应关系; 其中, 1–100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 三个处理组相比于对照组差异显著 ($p < 0.05$), 0.01 $\mu\text{g}/\text{L}$ 处理组差异不显著, 而比较两种毒素发现 MCLR 的毒性效应要高于 MCRR。

4.2 微囊藻毒素 MCLR 和 MCRR 复合暴露会对鱼体毒性产生协同效应, 低剂量的复合毒性相比于单独暴露组毒性差异显著 ($p < 0.05$), 而随着复合暴露剂量的增加, 毒性效应也随之增强, 与单独暴露组相比, 其差异极显著 ($p < 0.01$)。因此, 鲫鱼淋巴细胞的凋亡能够作为一种有效的指标来评价 MCs 复合污染引起的鱼体免疫毒性。

参考文献

- [1] Frangež R, Žuzek M C, Mrkun J, et al. Microcystin-LR affects cytoskeleton and morphology of rabbit primary whole embryo cultured cells in vitro. *Toxicol*, 2003, 41: 999–1005.
- [2] Francis G. Poisonous Australia lake. *Nature*, 1878, 18: 11–12.
- [3] de Figueiredo D R, Azeiteiro U M, Esteves S M, et al. Microcystin-producing blooms—a serious global public health issue. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2004, 59: 151–163.
- [4] Codd G A, Bell S G, Kaya K, et al. Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health. *European journal of phycology*, 1999, 34: 405–415.
- [5] Hoeger S J, Hitzfeld B C, Dietrich D R. Occurrence and elimination of cyanobacterial toxins in drinking water treatment plants [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005, 203(3): 231–242.
- [6] Heinze R. Toxicity of the cyanobacterial toxin microcystin-LR to rats after 28 days intake with the drinking water. *Environmental Toxicology*, 1999, 14: 57–60.
- [7] Frangež R, Kosec M, Sedmak B, et al. Subchronic liver injuries caused by microcystins. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, 2000, 440: 103–104.
- [8] Mankiewicz J, Tarczyska M, Fladmark K E, et al. Apoptotic effect of cyanobacterial extract on rat hepatocytes and human lymphocytes. *Environmental Toxicology*, 2001, 16: 225–233.
- [9] Lankoff A, Carmichael WW, Grasman KA, et al. The uptake kinetics and immunotoxic effects of microcystin-LR in human and chicken peripheral blood lymphocytes in vitro. *Toxicology*, 2004, 204: 23–40.
- [10] Yea SS, Kim HM, Oh HM, et al. Microcystin-induced down-regulation of lymphocyte functions through reduced IL-2 mRNA stability. *Toxicology Letters*, 2001, 122: 21–31.

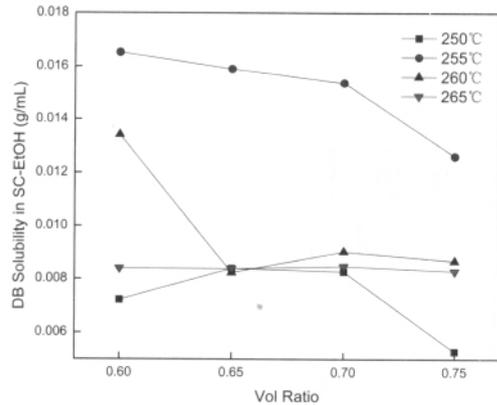


Fig.2.1 Effect of volume ratio on DB solubility in SC-EtOH

图 2.2 显示随着温度的升高, DB 的超临界乙醇中的溶解度在 255 °C 时出现极大值, 之后再次下降。其中 250 °C 时, DB 在容积比为 0.65 与 0.70 之间有略微的溶解性。在 260 °C 时, 溶解度在降低后维持稳定。在 265 °C 条件下, 溶质溶解度随压力增大而保持几乎不变。

实验也验证了温度对于超临界乙醇的扩散系数影响明显, 随着温度的升高, 扩散系数不断增加。温度的升高导致溶剂分子间的距离增大, 但本实验恒容状态下扩散空间并没有增大, 导致溶剂的密度及粘度增大, 使得扩散系数下降, 溶解效果出现下降。由实验结果可见, 温度对于超临界萃取的选择性的影响较大。

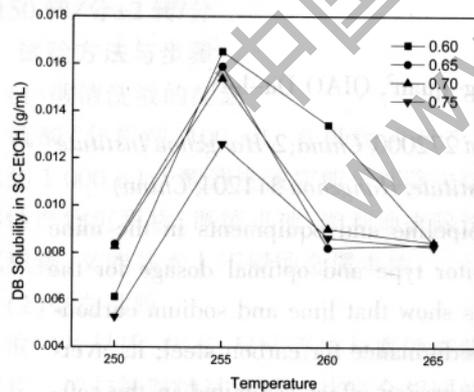


Fig.2.2 Effect of temperature on DB solubility in SC-EtOH

由上可知, 超临界乙醇对于氧芴有良好的溶解性, 并且萃取选择性明显。实验结果显示, 当温度在 255 °C, 容积比在 0.6, 及压力达到 7.0 MPa 时 DB 在超临界乙醇的溶解度达到最大, 为 0.01652 g/mL, 溶解度超过初始萃取浓度 106.5 %, 萃取溶解性效果明显。

3 结论

(1) 以乙醇为超临界溶剂, 在萃取温度为 255 °C、容积比为 0.6, 此时压力为 7.0 MPa, 氧芴在超临界乙醇中的溶解度最大。

(2) 通过恒容升温法研究固体物质在超临界流体中的溶解度的方法可行, 且简单易操作。

(3) 超临界溶剂乙醇是环境友好型溶剂, 便宜易得, 且易于回收利用, 所以将其应用于超临界萃取极性物质有着较大的应用前景。

参考文献

- [1] 丁一慧, 陈航, 王东飞. 高温煤焦油的超临界萃取分馏研究[J]. 燃料化学学报, 2010.38(2).
- [2] 李群生, 张泽廷, 刘延成, 等. 2-萘酚与苯甲酸在含夹带剂的超临界流体中溶解度的研究[J]. 化工进展, 2003.22(4).
- [3] 金君素, 李群生, 张泽廷, 等. 含夹带剂的超临界流体中固体溶解度的研究[J]. 石油化工, 2004.33(5).
- [4] Eduardo Pérez, Albertina Cabañas. High-pressure phase equilibria for the binary system carbon dioxide + dibenzofuran [J]. J. of Supercritical Fluids. 46 (2008) 238-244.
- [5] Eduardo Pérez, Albertina Cabañas. Cosolvent Effect of Methanol and Acetic Acid on Dibenzofuran Solubility in Supercritical Carbon Dioxide[J]. J. of Chem.Eng.Data 2008, 53,2649-2653.
- [6] 张志刚. 超临界流体过程相平衡实验研究[D]. 2006, 大连理工大学.
- [7] 郑晓彬, 王靖岱. 静态法测定固体溶质在超临界溶剂中的溶解度[J]. 现代化工, 2004.24(z1).
- [8] 刘丽丽, 张宝泉, 刘秀凤, 等. 加压和超临界条件下乙醇分子的缔合[J]. 化工学报, 2006.57(6).
- [9] 楚彩云, 张宝泉, 刘秀凤, 等. 溶剂极性对超临界乙醇中无限稀释扩散系数的影响[J]. 化工学报, 2004.55(6).

(上接第 20 页)

- [11] Liu Y, Song L, Li X, Liu T. The toxic effects of MC-LR on embryo-larval and juvenile development of loach, *Misgurnis mizolepis*. *Toxicol*, 2002, 40(4): 395-399.
- [12] 王连生, 韩朝晖. 有机污染化学进展[M]. 北京: 化学工业出版社, 1998.
- [13] 张晖, 孔繁翔, 王世和, 等. 多种环境雌激素对淡水鱼联合毒性作用的预测和评价[J]. 环境科学学报, 2008, 28(6): 1178-1185.

- [14] 赵玉琴, 李丽娜, 李建华. 常见拟除虫菊酯和有机磷农药对鱼类的急性及其联合毒性研究[J]. 环境污染与防治, 11: 53-57.
- [15] 王桂燕, 胡筱敏, 周启星, 等. 对二氯苯和镉对草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 的联合毒性效应研究[J]. 环境科学, 28 (1): 156-159.
- [16] 孟顺龙, 陈家长, 冷春梅. 除草剂阿特拉津与丁草胺对麦穗鱼的联合毒性研究[J]. 环境污染与防治, 2007, 29(4): 254-260.