

微囊藻毒素在鲢鱼体内生物富集 及其体内的抗氧化反应

杨静东^{1,2,3}, 胡梁斌^{3,4}, 周威¹, 陈健¹, 石志琦^{1*}

1. 江苏省农业科学院食品质量安全与检测研究所, 江苏 南京 210014; 2. 江苏东海农业局, 江苏 东海 222300;
3. 中华人民共和国农业部食品安全监控重点开放实验室, 江苏 南京 210014; 4. 河南科技学院食品学院, 河南 新乡 453003

摘要: 为了解微囊藻毒素在鲢鱼 *Carassius auratus* L. 体内生物富集作用, 用 LC/MS 监测不同时间的鲢鱼肝脏、肌肉, 以及饲养用水中痕量的微囊藻毒素。结果显示, 肌肉组织中 MC-RR 和 MC-LR 的含量在 18 d 时达到峰值, 分别为 7.87 ng·g⁻¹ 和 2.18 ng·g⁻¹; 而肝脏组织中 MC-RR 和 MC-LR 的含量在鲢鱼暴露 9 天时达到最高值, 分别为 25.30 ng·g⁻¹ 和 33.27 ng·g⁻¹。研究结果支持肝脏组织是 MCs 的主要靶向器官, 并且表明肝脏组织对 MC-LR 的富集量远大于 MC-RR, 而肌肉组织更易于积累 MC-RR。文章还研究了鲢鱼体内的抗氧化酶(SOD、CAT、GST、GR 酶)的活性变化, 对 MCs 介导的氧化胁迫进行了评估。通过分别测定暴露不同时间点(3、9、18 d)肝脏和肌肉组织中的抗氧化酶的活性, 发现它们的活性与组织中 MCs 的含量基本呈正相关, 可能对 MCs 介导的氧化胁迫有缓解作用。以上表明, MCs 能在鱼体内积累, 抗氧化系统虽可缓解, 但不能完全降解。因此食用被 MCs 污染的鱼类存在潜在的食品安全风险。

关键字: 微囊藻毒素; 抗氧化反应; 鲢鱼; 生物富集

中图分类号: Q143

文献标识码: A

文章编号: 1674-5906 (2009) 06-2044-07

在水污染日趋严重的今天, 蓝藻水华已经成为全球关注的热点问题。近几年, 我国太湖、滇池、巢湖以及武汉东湖等湖泊, 每年都有不同程度的蓝藻水华爆发。这些水华蓝藻不但破坏了原有的湖泊生态系统, 而且在有 50%~70% 的蓝藻水华爆发的水体可检测到藻毒素^[1], 其中微囊藻水华是淡水水华中危害最严重的一类, 它产生的微囊藻毒素(Microcystins, MCs)是具有生物活性的七肽单环肝毒素, 是目前发现的最强的肝脏肿瘤促进剂^[2], 其一般结构为环(D-丙氨酸-L-X-赤-8-甲基-D-异天冬氨酸-L-Y-Adda-D-异谷氨酸-N-甲基脱氢丙氨酸), 其中 Adda 为一种特殊的氨基酸, 结构为 3-氨基-9-甲氧基-2, 6, 8-三甲基-10-苯-4, 6-二烯酸, X 及 Y 为两种可变的 L 氨基酸^[3]。目前已发现 70 多种异构体^[4], 其中 MC-RR 和 MC-LR 是我国和世界在天然水体中检出频率最多和含量最高的 MCs 类型^[5]。而且, 有关微囊藻毒素引起的哺乳动物中毒事件早有报道^[5-7]。为此, 世界各国和国际组织都制定了严格的藻毒素限制标准, 如 WHO 推荐饮水中藻毒素上限标准为 1.0 μg·L⁻¹^[8], 加拿大健康组织规定饮用水中可接受的藻毒素最高为 0.5 μg·L⁻¹, 澳大利亚学者建议 1.0 μg·L⁻¹ 为安全饮用水的上限, 我国现颁布执行的生活饮用水水质卫生规范也包含了藻毒素的

检测项目^[9]。

尽管藻毒素在饮用水中的标准已经确定。但是, MCs 不但能通过饮用水直接危害到人的健康, 而且 MCs 还可以积累在水生有机体中, 进入食物链, 同样存在很大的安全风险。据报道浮游动物^[10-11]、软体动物^[12-13]和鱼^[14-15]都能积累大量 MCs, 而鲢鱼 *Carassius auratus* L. 是淡水湖泊比较常见的植食性鱼类。

MCs 的致毒机理主要是通过抑制肝细胞中蛋白磷酸酶的活性, 诱发细胞角蛋白高度磷酸化, 导致肝细胞微丝分解、破裂和出血^[16-17]。但有关报道还表明, 氧化胁迫也是 MCs 导致哺乳动物中毒的一个重要方面^[18-19], 但是氧化胁迫对鱼类的影响还鲜为报道。

本文着重研究 MCs 在鲢鱼肝脏和肌肉组织中的积累规律, 以及在 MCs 胁迫下, 鱼体内 SOD、POD、CAT、GST、GR 等抗氧化有关酶类的活性变化。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 材料与与方法

1.1 微囊藻毒素标准品

微囊藻毒素标准品 MC-RR(分子式 C₄₉H₇₅N₁₃O₁₂, 相对分子质量 1038.12)和 MC-LR(分

基金项目: 国家 973 预研项目(2008CB117001)

作者简介: 杨静东(1985 年生), 男, 硕士, 主要从事植物和微生物资源的研究。E-mail: smartforest@yahoo.cn

*通讯作者: 石志琦。E-mail: shizhiqi@jaas.ac.cn

收稿日期: 2009-09-27

子式 $C_{49}H_{74}N_{10}O_{12}$, 相对分子质量 995.12) 购于 Sigma 公司。

1.2 微囊藻毒素样品制备和鉴定

实验中使用的微囊藻毒素, 参考杨静东等^[20]从太湖水华蓝藻藻粉中提取和纯化, 并通过 HPLC 检测, 根据出峰时间, 确定提取液中 MC-RR 和 MC-LR 的含量。

1.3 试验鱼种和饲养条件

试验鱼种选鲈鱼 *Carassius auratus* L., 由南京农业大学动物科学院提供, 平均体长 9 cm, 平均体质量 50 g 每尾, 行动活泼、体色光泽、鱼鳍完整舒展、逆水性强、食欲好。试验容器采用玻璃缸, 其盛水量以每条鱼约 2 L 水为宜。鱼的生长环境严格控制, 用至少放置 3 d 的脱氯自来水作为饲养用水, 水温控制在 $(21 \pm 2)^\circ\text{C}$, L/D: 12h-12h, 溶解氧保持在 $6.0 \sim 7.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.6 ± 0.3 , Ca^{2+} $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Mg^{2+} $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。鱼饵料购于南京农业大学动物科学院, 投食前经液相 LC/MS 测定, 不含微囊藻毒素, 驯养一周后进行试验。

实验分为试验组和空白对照组, 各 3 个重复, 每小组 12 尾鱼, 实验组每个鱼缸一次性投放一定量的微囊藻毒素, 使鱼缸中 MC-RR 和 MC-LR 的浓度大约在 $60 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[21]。试验每 3 天取一次样, 鱼 2 尾, 水样 2 mL。试验持续 18 d, 各组鲈鱼处死后取背部肌肉和肝脏, 测定微囊藻毒素 MC-RR 和 MC-LR 的含量。

1.4 鱼肉组织中 MCs 的提取

称取冻干组织样品 0.3~0.5 g (粉状), 加入 10 mL 丁醇/甲醇/水 (体积比: 5/20/75), 搅匀后超声处理 10 min, $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 收集上清, 沉淀按以上操作重复两次, 收集上清。混合 3 次提取液转至锥形瓶中 35°C 旋转蒸发至 5 mL, 用少量水稀释后, 全部转至 C_{18} 柱过滤, 5 mL 水洗, 5 mL $\varphi=20\%$ 甲醇淋洗, 用 5 mL $\varphi=90\%$ 甲醇洗脱, 收集洗脱液。冷冻干燥后, 残渣溶于 $\varphi=100\%$ 甲醇。将重悬液经硅胶柱过滤 (0.69 g 硅胶至 2 g 硅胶柱中, $\varphi=100\%$ 甲醇预平衡), 用 $\varphi=100\%$ 甲醇淋洗后, $\varphi=70\%$ 甲醇洗脱, 收集滤液, 冷冻干燥后, 溶于 10 μL 甲醇, LC/MS 测定。

1.5 色谱分析条件

HPLC (Agilent 1100) 测定条件: 流动相甲醇:水 (含 0.05% 三氟乙酸) = 55:45, 柱温 40°C , 流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 紫外检测波长 238 nm, 进样量 20 μL , 分离柱 Cosmosil C18-AR-II (250 \times 4.6 mm, 5 μm 粒径)。

LC/MS (Agilent 6410) 测定条件: 液相分离柱是 ZORBAX SB-C18 (30 mm \times 2.1 mm 3.5 μm 粒径), 柱温 23°C , 流动相 55% 甲醇 (φ):45% 水, 两相中都加

入了 $\varphi=0.1\%$ 甲酸, 而且在水相中还加入了 $\varphi=0.05\%$ 的三氟乙酸, 流速 $0.4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 紫外检测波长 238 nm, 进样量 5 μL ; 质谱电喷雾 ESI 源, 雾化气为氮气, 压力为 25 psi; 干燥气为氮气, 流速为 $10 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, 温度为 350°C ; 质谱 MRM 模式, 碰撞气为高纯氮气, 毛细管电压为 4 kV, 出口电压为 50 V, 光电倍增管电压 650 V。

1.6 抗氧化酶活性的测定

酶的提取和分析参照 Qiu 等^[22]的方法, 取鲈鱼的肝脏, 按 1:10 (w/v) 的比例, 立即加入到 4°C 预冷的 pH 7.5 的缓冲液 (蔗糖, $250 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 苯甲磺酰氟, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; EDTA, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 中, 并匀浆, 4°C 下 $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 上清液即为酶液, 用于抗氧化酶活性分析。

超氧化物歧化酶 (SOD) 活性的测定采用氮蓝四唑 (NBT) 光化还原法测定^[23], 以抑制 NBT 光化学还原的 50% 为 1 U, 测定波长为 560 nm; 过氧化氢酶 (CAT) 活性采用过氧化氢法测定^[24]。谷胱甘肽硫转移酶 (GST) 的活性根据 Habig 等^[25]的方法, 用 1-氯-2,4-二硝基苯 (CDNB) 作为底物, 在 340 nm 下监测 CDBN 与 GSH 复合物的生成量。谷胱甘肽还原酶 (GR) 的活性参考 Carlberg 等^[26]的方法, 在 340 nm 下监测 NADPH 的氧化。蛋白质含量采用考马斯亮蓝法^[27]。

1.7 统计分析

采用 SPSS 16.0 windows 软件对数据进行录入和统计分析, 并用 origin 7.5 专业软件进行作图。

2 结果

2.1 MC-RR 和 MC-LR 在鲈鱼肝脏、肌肉中的生物富集

鲈鱼暴露在含有 MC-RR 和 MC-LR 的水体中, 如图 1 所示, 在 18 d 内, 随着暴露时间的增加, 饲养用水中, MCs 的含量不断降低。鲈鱼的肌肉组织中, MC-RR 和 MC-LR 的含量逐渐增加, 到第 18 天到达最高值, 分别为 $7.87 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $2.18 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 。但肝脏组织中 MC-RR 和 MC-LR 的含量在鲈鱼暴露第 9 天时达到最高值, MC-RR 和 MC-LR 的富集量分别为 $25.30 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $33.27 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, 9 d 后, 发现 MC-RR 的含量在肝脏组织中没有增加的趋势, MC-LR 在肝脏中的含量还有所降低。从总体上说, 肝脏组织对 MC-LR 的富集量远大于 MC-RR, 而肌肉组织中则相反。

2.2 MC-RR 和 MC-LR 对抗氧化酶活性的影响

如图 2 所示, 鲈鱼暴露在含有 MC-RR 和 MC-LR 的水体中 3 d 后, SOD 酶的活性与对照相比, 没有明显的变化。但到 9 d 后, 肝脏 ($p < 0.01$) 和肌肉 ($p < 0.05$) 组织中 SOD 酶的活性都有明显的增加, 尤其是肝脏组织中, SOD 酶的活性是对照的 1.6 倍。暴露 18 d 时,

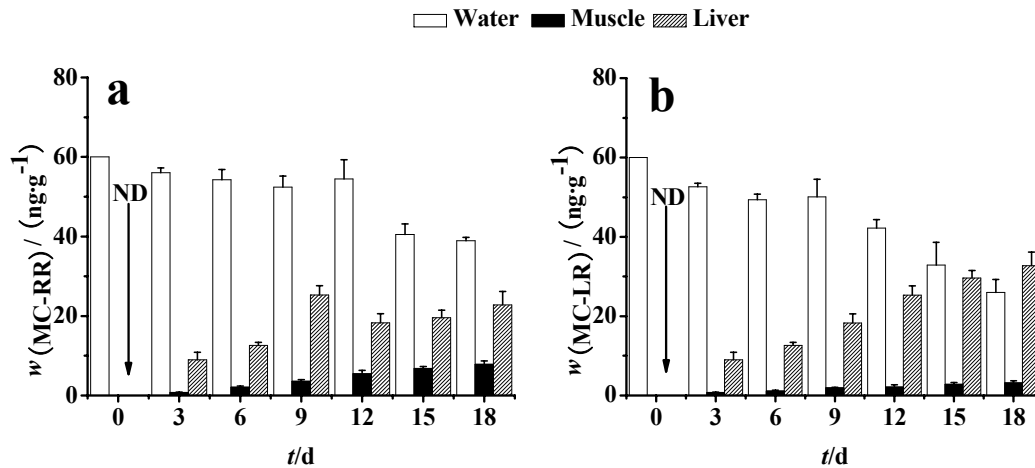


图1 鲢鱼的肝脏、肌肉中对微囊藻毒素MC-RR和MC-LR的生物富集
Fig.1 Biological enrichment of MC-RR and MC-LR in liver and muscle of *Carassius auratus L.*

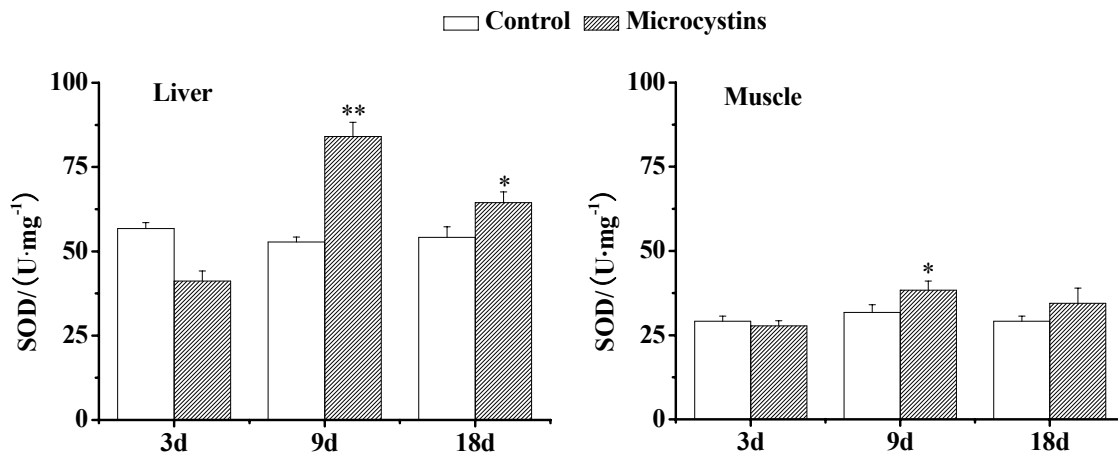


图2 测定不同时间点对照组及暴露在藻毒素水体(初始MC-RR和MC-LR的浓度都是 $60\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)的鱼肝及肌肉中SOD酶的活性
Fig.2 Superoxide dismutase activity in liver and muscle of control fish and fish exposed to Microcystins (MC-RR and MC-LR offered to fish were both of $60\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) was monitored at different time

实验设3个重复, SOD酶的活性用毫克蛋白中酶的活力单位表示。分别在 $*p < 0.05$ 和 $**p < 0.01$ 水平上, 比较其与对照组的差异显著性

肝脏组织中, SOD酶的活性虽然有所降低, 但与对照相比, 在 $p < 0.05$ 水平上有显著差异; 但肌肉组织中SOD酶的活性有所下降, 与对照酶有显著差异。

与SOD酶活性的变化有所不同(图3), 暴露3 d后, 与对照组相比, CAT酶的活性没有丝毫的变化, 但到9天后, 无论是肝脏($p < 0.01$)还是肌肉($p < 0.01$)组织中CAT酶的活性都有了很明显的增长, 肝脏中, CAT酶的活性是对照组的2.3倍, 肌肉中, CAT酶的活性是对照组的2.1倍。第18天时, 肝脏和肌肉组织中, CAT酶的活性与对照相比, 依然在 $p < 0.01$ 水平上表现出显著性差异。

如图4所示, 在短暂的暴露时间内(3 d内), 具有解毒功能的GST酶的活性没有变化, 随着暴露时间

的增加(9 d), 肝脏组织中的GST酶活性有显著增强($p < 0.01$), 但肌肉组织中的GST酶活性没有显著增强。第18天时, 肝脏中GST酶的活性有所降低, 但与对照相比, 有显著差异($p < 0.01$); 肌肉组织中, GST酶的活性虽然有稍微的增加, 但与对照相比, 没有显著性差异。

当鲢鱼暴露在藻毒素下3 d时, 肝脏和肌肉组织中的GR酶活性也没有明显的增强, 到第9天时, GR酶的活性无论是在肝脏($p < 0.01$)还是肌肉($p < 0.01$)组织中都有明显的升高。第18天时, GR酶的活性依然保持很高的活性。

3 讨论

鱼作为水体中的主要栖息者, 也是最被动最直

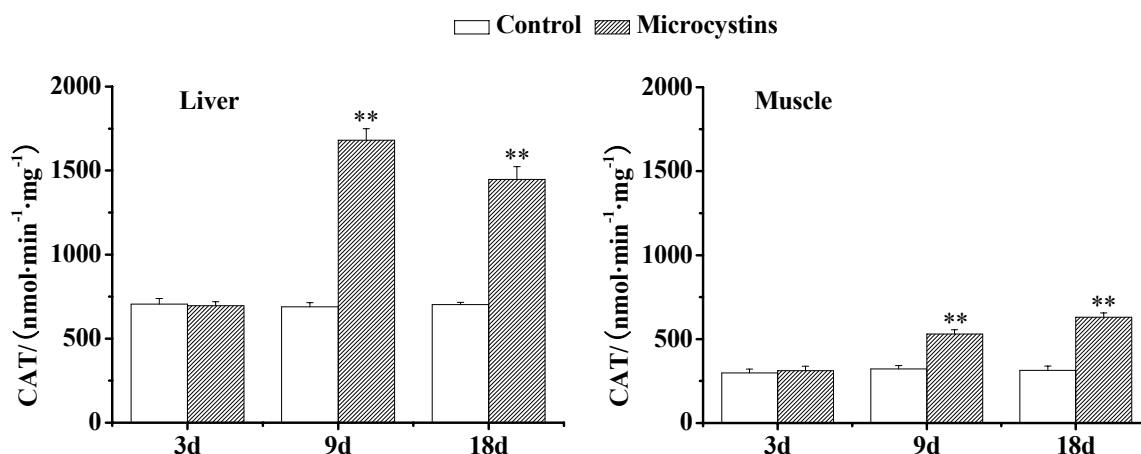


图3 测定不同时间点对照组及暴露在藻毒素水体(初始MC-RR和MC-LR的浓度都是 $60 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)的鱼肝及肌肉中CAT酶的活性

Fig.3 Catalase activity in liver and muscle of control fish and fish exposed to Microcystins

(MC-RR and MC-LR offered to fish were both of $60 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) was monitored at different time

实验设3个重复, CAT酶的活性用每分钟每毫克蛋白中过氧化氢的消耗量来表示。分别在 $*p < 0.05$ 和 $**p < 0.01$ 水平上, 比较其与对照组的差异显著性

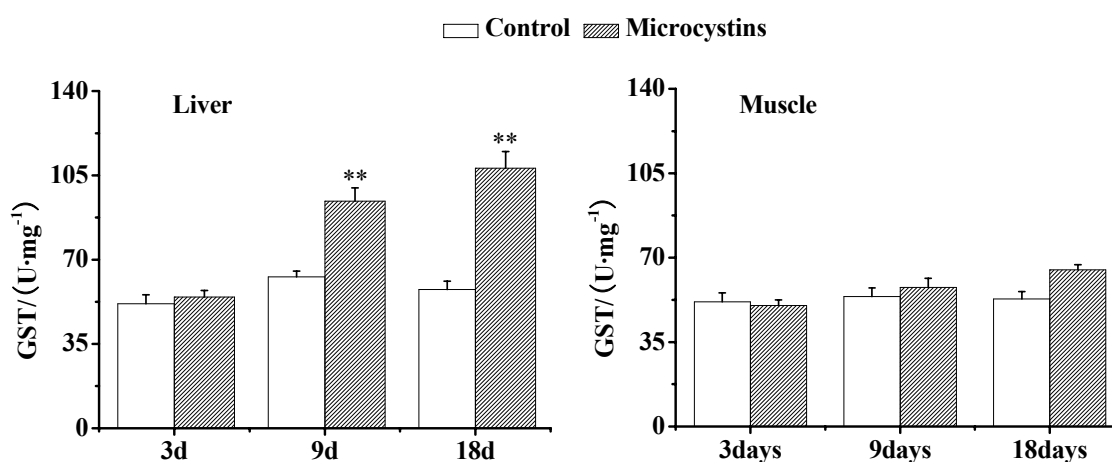


图4 测定不同时间点对照组及暴露在藻毒素水体(初始MC-RR和MC-LR的浓度都是 $60 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)的鱼肝及肌肉中GST酶的活性

Fig.4 Glutathione-S-transferase activity in liver and muscle of control fish and fish exposed to Microcystins

(MC-RR and MC-LR offered to fish were both of $60 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) was monitored at different time

实验设3个重复, GST酶的活性用每毫克蛋白中酶的活力单位表示。分别在 $*p < 0.05$ 和 $**p < 0.01$ 水平上, 比较其与对照组的差异显著性

接暴露在MCs污染水体中的一大类水生生物。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, 本研究运用LC/MS检测鱼体内痕量的微囊藻毒素, 揭示了MCs在鲢鱼体内的积累规律。

根据Chen等(2008)报道的太湖水体MCs季节性变化的动态参数, 太湖水体MCs的季节性平均浓度大约为 $60 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。所以, 本研究中MC-RR和MC-LR的处理浓度都设为 $60 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 经过18 d的

监测, 没有鱼死亡的现象, 可能是由于鱼类等无脊椎动物对MCs的低敏感性。而且发现肝脏中MCs的积累远大与肌肉组织中, 大约为肌肉组织中的18倍, 可见肝脏组织是MCs的主要靶向器官, 这也与Mohamed等(2003)研究MCs在罗非鱼体内的积累规律类似^[15]。

本文研究还表明, 肝脏和肌肉组织对MC-RR和MC-LR的富集量也有所不同, 对于MC-LR的富集量略大于MC-RR; 而肌肉组织对MC-RR的富集量比对MC-LR富集量高, 每9天时高出3倍, 第18天时高出6倍。由此可见, MC-LR更容易积累

在肝脏组织中,而MC-RR更容易被吸收转运到肌肉中。前人的研究也表明,MC-RR更容易被吸收入水生生物的组织中去,例如白鲢^[28]、虾或者水螺^[29]。根据Xie等(2004)的研究,之所以MC-LR与MC-RR的比例在不同器官和组织中的含量不同,鱼的肠粘膜对MC-LR的吸收可能是选择性的,不能随意通过肠粘膜,在消化的过程中比较容易被降解,MC-RR则容易穿透肠粘膜,能镶嵌在各种器官组织中,不容易被降解。而实际上,从微囊藻毒素的分子结构不能看出这一点,MC-RR和MC-LR唯一的不同在于其2号氨基酸为精氨酸,MC-LR相应的位置为亮氨酸^[3],精氨酸为带电荷的碱性氨基酸,而亮氨酸为非极性氨基酸^[30],因此,MC-RR比MC-LR有更好的水溶性,更容易被吸收转运。

很多的研究都已经证实,环境应激物会对水生生物造成氧化胁迫^[31]。在正常情况下,生物体内SOD和CAT等可及时清除受环境胁迫时产生的过量活性氧,从而使活性氧的产生和清除保持一种动态平衡。从本文的研究结果来看,MCs的富集,介导了鲢鱼的肝脏和肌肉的氧化胁迫。第9天时,MCs达到了一个监测阶段的最高值,相应的抗氧化酶的活性基本达到了最高。但也有些例外,就SOD酶和CAT酶的活性而言,一般来说,在相同的环境应激物刺激下,SOD酶和CAT酶的活性的变化是一致的^[32]。但从本文的研究来看,肌肉组织中(图2、图3),这两者没有固有的联系,当鲢鱼暴露在含有MCs的水体中9d时,SOD酶的活性增加了0.2倍,而CAT酶的活性增加了1倍,到第18天时,SOD酶的活性略有下降,而CAT酶的活性比第9天时的更高。Li

等(2003)的报道也表明,SOD酶和CAT酶的活性在白鲢 *Cyprinus carpio* L. 肝脏中都有明显的上升,而在肾脏中,则CAT酶的活性增加了2.7倍,而SOD酶的活性没有显著增加。由此可见,不同组织中,同种抗氧化酶对MCs的敏感性略有不同。

GST酶主要分为cGST和mGST两种,功能是催化MCs-GSH共轭体的形成,即催化MCs 7号位Mdh和GSH以甲硫键相连^[33]。形成的MCs-GSH结构,不但毒性大大降低,而且容易被排泄出体外。根据Pflugmacher等(2004)人的报道,许多动物及大型水生生物都具有这样的MCs去毒机制^[34],鲢鱼肝脏中的GST酶活性有明显增强(图4),可见鲢鱼体内同样具有除毒功能,尤其是肝脏组织。

GR酶的活性对于细胞的抗氧化保护同样起着至关重要的作用,因为它催化了氧化型谷胱甘肽(GSSG)向还原性谷胱甘肽(GSH)的转变。而GSH是GST酶的底物,它含量的多寡,直接影响到机体的除毒功能。无论是肝脏还是肌肉组织中,GR酶都表现了很高的活性。这也印证了Stephensen等(2000)的研究,只要有氧化胁迫存在,GR酶都表现出很高的活性^[35]。

4 结论

(1)根据MCs在鲢鱼体内不同部位积累的差异,发现肝脏组织是MCs的主要靶向器官,并且表明肝脏组织对MC-LR的富集量远大于MC-RR,而肌肉组织更易于积累MC-RR。

(2)在MCs的胁迫条件下,鲢鱼体内的抗氧化酶的活性有明显的变化,并且发现它们的活性与组织中MCs的含量基本呈正相关,由此可见,抗氧

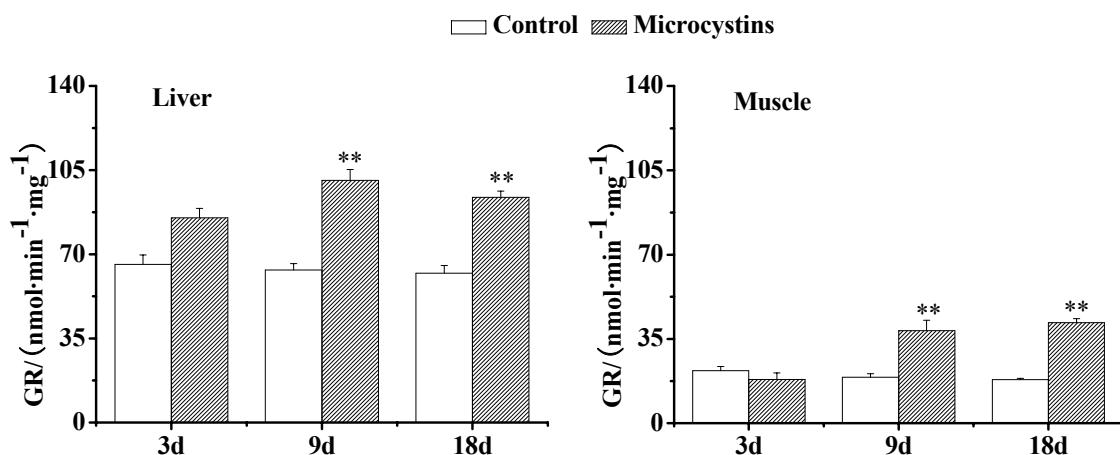


图5 测定不同时间点对照组及暴露在藻毒素水体(初始MC-RR和MC-LR的浓度都是 $60 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)的鱼肝及肌肉中GR酶的活性

Fig.5 Glutathione reductase activity in liver and muscle of control fish and fish exposed to Microcystins (MC-RR and MC-LR offered to fish were both of $60 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) was monitored at different time

实验设3个重复,GR酶的活性用每分钟每毫克蛋白中NADPH被氧化的量表示。分别在 $*p < 0.05$ 和 $**p < 0.01$ 水平上,比较其与对照组的差异显著性

化酶可能对 MCs 介导的氧化胁迫有缓解作用。

(3)MCs 在鲈鱼的肝脏和肌肉组织中都有积累, 抗氧化系统虽可缓解, 但不能完全降解, 可能存在潜在食品安全风险。

参考文献:

- [1] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Algae and Cyanobacteria in Freshwater[M]//Guidelines for Safe Recreational Water Environments, vol. 1: Coastal and Fresh Waters. Geneva, Switzerland, 2003: 136-158.
- [2] SHEPHARD G S, STOCKENSTROM S, VILLIERS D, et al. Degradation of microcystin toxins in a failing film photocatalytic reactor with immobilized titanium dioxide catalyst[J]. Water Research, 2002, 36: 140-146.
- [3] BOTES D P, TUINMAN A A, WESSELS P L, et al. The structure of cyanoginosin-LA, a cyclic heptapeptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*[J]. Journal of Chemical Society, Perkin Transaction, 1984, 1: 2311-2318.
- [4] SIVONEN K, JONES G. Cyanobacterial Toxins [M]// CHORUS I, BARTRAM J, eds. Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management. New York: E & FN Spon, 1999: 41-111.
- [5] POURIA S. A fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru[J]. Brazil Lancet, 1998, 352 (2): 21-26.
- [6] FRANDIS G. Poisonous Australian lake[J]. Nature, 1878, 18:11-12.
- [7] CARMICHAEL W W, FALCONER I R. Diseases Related to Freshwater Blue-Green Algal Toxins, and Control Measures[M]// FALCONER I R, ed. Algal Toxins in Seafood and Drinking Water. London: Academic Press, 1993: 187-209.
- [8] World Health Organization. Guidelines for Drinking Water Quality [M]. 3rd ed. Geneva, 2004: 195.
- [9] 盛建武, 何苗, 施汉昌, 等. 水环境中微囊藻毒素检测技术研究进展[J]. 环境污染与防治, 2006, 28: 132-136.
- [10] SHENG Jianwu, HE Miao, SHI Hanchang, et al. Review on detection technologies of microcystins in aquatic environment[J]. Environmental Pollution and Control, 2006, 28: 132-136.
- [11] WATANABE M F, TSUJI K, WATANABE Y. Release of heptapeptide toxin (MCYST) during decomposition process of *Microcystis aeruginosa*[J]. Natural Toxins, 1992, 1: 448-453.
- [12] THOSTRUP P H, CHRISTOFFERSEN K. Accumulation of microcystin in *Daphnia magna* feeding on toxic *Microcystis*[J]. Archiv Fur Hydrobiologie, 1999, 14:447-467.
- [13] ERRIKSSON J E, MERILUOTO J A O, MLINDHOL T. Accumulation of a peptide toxin from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii* the freshwater mussel[J]. Anodonta Cygnea Hydrobiology, 1989, 183: 211-216.
- [14] VASCONCELOS V M. Uptake and depuration of the peptide toxin microcystin- LR in *Mytilus galloprovincialis*[J]. Aquatic Toxicology, 1995, 32: 227-237.
- [15] SIPIA V O, KANKAANPAA H T, FLINKMAN J, MERILUOTO J A. Time-dependent accumulation of cyanobacterial hepatotoxins in flounders (*Platichthys flesus*) and mussels (*Mytilus edulis*) from the northern Baltic Sea[J]. Environmental Toxicology, 2001, 16: 330-336.
- [16] MOHAMED Z A, CARMICHAEL W W, HUSSEIN A A. Estimation of microcystins in the fresh water fish *Oreochromis niloticus* in an Egyptian fish farm containing a *Microcystis* bloom[J]. Environmental Toxicology, 2003, 18: 137-141.
- [17] ELLENMAN T C, FALCONER I R, JACKSON A R B et al. Isolation, characterization and pathology of the toxin from a *Microcystis aeruginosa* (= *Anacystis cyanea*) bloom[J]. Australian Journal of Biological Sciences, 1978, 31: 209-218.
- [18] HERMANISKY S J, STOHS S J, MARKIN R S et al. Hepatic lipid peroxidation, sulfhydryl status, and toxicity of the bluegreen algal toxin microcystin-LR in mice[J]. Journal of Toxicology and Environmental Health, 1990, 31: 71-91.
- [19] BOUAICHA N, MAATOUK I. Microcystin-LR and nodularin induce intracellular glutathione alteration, reactive oxygen species production and lipid peroxidation in primary cultured rat hepatocytes[J]. Toxicology Letters, 2004, 148 (1-2): 53-63.
- [20] ZEGURA B, LAH T T, FILIPIC M. The role of reactive oxygen species in microcystin-LR induced DNA damage[J]. Toxicology, 2004, 200: 59-68.
- [21] 杨静东, 尹玉芬, 胡梁斌, 等. 微生物菌群 JSM004 对微囊藻毒素的生物降解[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(8): 1669-1675.
- [22] YANG Jingdong, YIN Yufen, HU Liangbin, et al. Biodegradation of microcystins by indigenous mixed bacterial population JSM004[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2009, 28(8): 1669-1675.
- [23] WEI C, LIRONG S, LIANG P. Reduction in microcystin concentrations in large and shallow lakes: Water and sediment-interface contributions[J]. Water research, 2008, 42: 763-773.
- [24] TONG Q, PING X, ZHIXIN K. In situ studies on physiological and biochemical responses of four fishes with different trophic levels to toxic cyanobacterial blooms in a large Chinese lake[J]. Toxicon, 2007, 50: 365-376.
- [25] BAYER W F, FRIDOVICH J L. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions[J]. Analytical Biochemistry, 1987, 161: 559-566.
- [26] CLAIBORNE A. Catalase Activity[M]//GREENWALD R A, ed. CRC Handbook of Methods in Oxygen Radical Research. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1985: 283-284.
- [27] HABIG W H, PASBI M J, JAKONBY W B. Glutathione-S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation[J]. 1974, 249: 7130-7139.
- [28] CARLBERG I, MANNERVIK B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver[J]. Journal of Biological Chemistry, 1975, 250: 5474-5480.
- [29] BRADFORD M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry. 1976, 72: 248-254.
- [30] JANG M H, HA K, LUCAS M C et al. Changes in microcystin production by *Microcystis aeruginosa* exposed to phytoplanktivorous and omnivorous fish[J]. Aquatic Toxicology, 2004, 68(1): 51-59.
- [31] CHEN J, XIE P. Tissue distributions and seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins-LR and -RR in two freshwater shrimps, *Palaeomonetes modestus* and *Macrobrachium nipponensis*, from a large shallow, eutrophic lake of the subtropical China[J]. Toxicon, 2005, 45(5): 615-625.
- [32] 周顺伍. 动物生物化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008: 9-10.

- ZHOU Shunwu. Animal Biochemistry[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2008: 9-10.
- [31] WISTON G W, DIGIULIO R T. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms[J]. Aquatic Toxicology, 1991, 19: 137-161.
- [32] DIMITROVA M S T, TSINOVA V, VELCHEVA V. Combined effects of zinc and lead on the hepatic superoxide dismutase-catalase system in carp (*Cyprinus carpio*)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology: Part C, 1994, 108: 43-46.
- [33] MING D, PING X, GAODAO L. Simultaneous determination of microcystin-LR and its glutathione conjugate in fish tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography B, 2008, 862: 43-50.
- [34] PFLUGMACHER S. Promotion of oxidative stress in the aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum* during biotransformation of the cyanobacterial toxin microcystin-LR[J]. Aquatic Toxicology 2004, 70(3): 169-178.
- [35] STEPHENSEN E, SVAVARSSON J, STURVE J. et al. Biochemical indicators of pollution exposure in shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*), caught in four harbours on the southwest coast of Iceland[J]. Aquatic Toxicology, 2000, 48: 431-442.

Bioaccumulation of microcystin and antioxidative response in *Carassius auratus* L.

YANG Jingdong^{1,2,3}, HU Liangbin^{3,4}, ZHOU Wei¹, CHEN Jian¹, SHI Zhiqi^{1*}

1. Institute of Food Safety, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Donghai Bureau of Agriculture, Donghai 222300, China;

3. Key Laboratory of Food Safety Monitoring and Management, Ministry of Agriculture, The People's Republic of China, Nanjing 210014, China;

4. School of Food, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China

Abstract: In order to investigate the bioaccumulation of microcystins(MCs) in *Carassius auratus* L., the level of MCs in liver, muscle and water was monitored by LC/MS at different time after exposure. The results indicated that the level of MC-RR and MC-LR was the highest in muscle on the 18th day after exposure, with each amount of 7.87 ng/g and 2.18 ng/g, and reached the peak in liver on the 9th day with the amount of 25.30 ng/g and 33.27 ng/g respectively. The results showed that the bioaccumulation of MCs is prone to occur in liver than in muscle. The level of MC-LR was higher than MC-RR in liver, and the MC-RR was prone to accumulate in muscle. The oxidative stress of fish mediated by MCs was also evaluated by analyzing the activities of several antioxidases such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), Glutathione-S-transferase (GST) and glutathione reductase (GR). The activities of these antioxidases in liver and muscle were measured after exposing to MCs after 3, 9 and 18 days. It was demonstrated that the level of MCs was basically positive-correlated to the activity of antioxidase, which probably released the oxidative stress mediated by MCs. Overall, fish can accumulate microcystins and make response to the toxicity with antioxidative system, but can not degrade the MCs completely. So it should be noted that people with whose diets contain the fish exposed to MCs, would potentially suffer the health threaten.

Key words: microcystins; antioxidative response; *Carassius auratus* L.; bioaccumulation