

当代杰出青年科学文库

# 水生动物体内的微囊藻毒素 及其对人类健康的潜在威胁

谢 平 著

科 学 出 版 社  
北 京

## 内 容 简 介

本书是一部论述由蓝藻产生的一类毒性极强的天然的环肽肝毒素——微囊藻毒素(microcystin, MC)在水生动物体内的生物累积及其对人类健康的潜在威胁的专著,作者首先概述了MC的化学结构和性质、稳定性和致毒的分子机制以及动物体内MC的萃取与检测技术,接下来详细地介绍了国内外有关水生动物(鱼类、软体动物、虾蟹)对MC摄取、清除、生物富集规律的野外和实验研究,然后简述了MC在水生动物体内的药代动力学过程研究以及MC在水生动物体内累积的一般模式,最后就MC对人类健康的危害(特别是为何人类等哺乳动物比水生动物对MC更加脆弱)进行了系统的分析。

本书可供环境毒理学、食品安全、公共卫生、环境化学、水产、动物生理学等相关领域的研究人员和管理人员、大专院校师生参考。

### 图书在版编目(CIP)数据

水生动物体内的微囊藻毒素及其对人类健康的潜在威胁/谢平 著. —北京: 科学出版社, 2006

(当代杰出青年科学文库)

ISBN 7-03-017244-2

I. 水… II. 谢… III. 水生动物-藻类-毒素-研究 IV. Q958.85

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2006)第 048871 号

责任编辑: 韩学哲 彭克里 席 慧/责任校对: 赵桂芬

责任印制: 钱玉芬/封面设计: 王 浩

**科学出版社** 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

**中国科学院印刷厂** 印刷

科学出版社编务公司排版制作

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2006 年 9 月第 一 版 开本: B5 (720×1000)

2006 年 9 月第一次印刷 印张: 00 0/0

印数: 0—0 000 字数: 000 000

**定价: 64.00 元**

(如有印装质量问题, 我社负责调换〈环伟〉)

# **Microcystins in Aquatic Animals with Potential Risk to Human Health**

*by*

Xie Ping

Science Press, Beijing

本书的出版及部分研究内容主要得到中国科学院知识创新工程方向性项目(编号 KSCX2-SW-129)的资助,部分得到华中农业大学水产学院讲座教授基金及国家自然科学基金重点基金(编号 30530170)的联合资助。

# 前 言

蓝藻(blue-green algae)也称为蓝细菌(cyanobacteria),是一类古老的生物,广泛分布于淡水、咸淡水、海水和陆生环境,它们在元素的生物地球化学循环以及在维持生态系统的结构、功能和生物多样性方面具有重要的作用。另一方面,这类呈革兰氏阴性(gram-negative)的原核生物,虽然不能寄生于人类或动物体内而引起疾病,但它们却能产生一系列毒性很强的天然毒素[称为蓝藻毒素(cyanotoxin)]危及人类的健康(Codd et al. 2005)。

根据化学结构,蓝藻毒素可分为三类:环肽(cyclic peptide)、生物碱(alkaloid)和脂多糖内毒素(lipopolysaccharide, LPS);再根据毒素对动物的致毒方式,可分为具有肝毒性的(hepatotoxic)环肽毒素——微囊藻毒素(microcystin, MC)和节球藻毒素(nodularin),具有神经毒性的(neurotoxic)生物碱毒素——类毒素(anatoxin)和石房蛤毒素(saxitoxin),具有细胞毒性的(cytotoxic)生物碱毒素——拟柱胞藻毒素(cylindrospermopsin),具有皮炎毒性的(dermatotoxic)生物碱毒素——海兔毒素(aplysiatoxin)和鞘丝藻毒素(lyngbyatoxin),具有刺激性的(irritant)毒素——LPS,以及其他生物活性物质(Sivonen and Jones 1999)。

从全球范围来看,在淡水环境的水华中发现的最常见的蓝藻毒素为环肽毒素MC。环肽毒素的分子质量为800~1100 Da,其中,MC由7个氨基酸组成,而节球藻毒素由5个氨基酸组成。MC产自浮游性蓝藻——微囊藻(*Microcystis*)、鱼腥藻(*Anabaena*)、颤藻(*Oscillatoria* 或 *Planktothrix*)、念珠藻(*Nostoc*)、项圈藻(*Anabaenopsis*),以及陆生的软管藻(*Hapalosiphon*),而节球藻毒素主要产自咸淡水中的节球藻 *Nodularia spumigena*(Codd 2000, Carmichael 2001)。

肽为氨基酸的聚合物,由前一个构建单元的羧基与后一单位的氨基以酰胺键(肽键)连接而成。组成少于15个氨基酸的称为寡肽,15~50个氨基酸称为多肽,大于50个氨基酸一般就称为蛋白质。肽及其近亲——蛋白质在活细胞中的几乎所有生命活动中都具有重要功能。在进化过程中,许多物种(如细菌、植物、无脊椎动物、蛇)产生毒性多肽和蛋白质,其目的或者出于对捕食者的防御,或者是为了争夺有限的营养资源而进行的积极进攻。由于一些肽类在生物体内具有重要的生理生化功能,人们的主要兴趣在于肽类在药理和医学上的应用。

线形肽的氨基端和羧基端通过肽键形成环肽。环肽构成了众多天然肽的一个大类,它们以激素、抗生素、离子载体系统、抗真菌素、癌抑制剂以及毒素的形式展现出丰富多样的生物活性;在过去的40多年里,从植物、真菌、细菌及海洋生物中分离得到的特殊结构的环肽数目迅速增加(Sewald and Jakubke 2002)。本书

关注的对象是一类由蓝藻产生的天然环状七肽肝毒素。

1990年,科学家首次发现,MC进入肝细胞后,能强烈地抑制蛋白磷酸酶(PP-1、PP-2A)的活性(Yoshizawa et al. 1990)。1996年,在巴西发生了肾透析用水被MC(MC-LR、MC-YR和MC-AR)污染导致52人死亡的严重事件(Carmichael et al. 2001, Azevedo et al. 2002)。中国南方原发性肝癌的高发病率被认为与饮水中的MC污染有关(Ueno et al. 1996, 俞顺章等 2001)。1998年,世界卫生组织提出了饮用水中MC-LR含量的临时(provisional)指导值为 $1\ \mu\text{g/L}$ (WHO 1998)。在MC的70多种异构体中,MC-LR最为常见且相关研究最多,腹腔注射小白鼠的 $\text{LD}_{50}$ 值一般在 $50\sim 60\ \mu\text{g/kg BW}$ (Kuiper-Goodman et al. 1999),因此,MC-LR的毒性可与化学类有机磷神经毒剂(chemical organophosphate nerve agent)相当(Dawson 1998)。

一般认为,MC进入人体的途径主要是通过饮水,少部分通过娱乐活动或通过口服蓝藻类保健品,或特殊的情况下通过静脉输入影响一些脆弱的透析患者(WHO 1998, Carmichael et al. 2001)。迄今为止,饮用水中的MC污染问题受到广泛关注(Chorus and Bartram 1999),相比之下,有关MC在水生动物(水产品)体内生物富集的研究要少得多。我国湖泊的富营养化十分严重,有毒蓝藻水华大量发生(如云南滇池、江苏太湖、安徽巢湖等),渔产品(鱼、虾、蟹、螺、蚌)中的MC含量普遍较高或很高(Chen and Xie 2005a, b, Chen et al. 2005, Xie et al. 2005),而淡水渔产品又是我国国民动物蛋白的重要来源,因此,渔产品的MC污染对人类健康的潜在威胁不容忽视。

本书专门论述MC在水生动物体内的生物富集规律及其对人类健康的潜在威胁。第一章是MC的概论,主要涉及产毒蓝藻与MC的毒性、MC的化学结构和性质、稳定性和致毒的分子机制。第二章介绍关于动物体内MC的萃取与检测技术,令人头痛的是,对分布于动物体内各种组织器官中的MC,仍然需要相当复杂和烦琐的样品预处理(分离、纯化)后才能进行分析测定。从第三章到第七章,详细地介绍了作者所能获得的国内外有关水生动物(鱼类、软体动物、虾蟹)对MC摄取、清除、生物富集的所有野外和实验研究,在这些章节中作者给予的评述很少。第八章主要是药代动力学简介,令人感慨的是关于MC在水生动物体内的药代动力学过程的研究十分稀少,很少计算MC的药代动力学参数。第九章论述MC在水生动物体内累积的一般模式,其中一个重要的问题是关于MC是否沿食物链进行生物放大。第十章论述MC对人类健康的危害,重点分析包括人类在内的陆生哺乳动物是否比水生动物对MC更加脆弱,特别关注其与不同动物类群循环系统的进化与血压之间的可能关系,读完最后一章,也许会相信,对MC这种破坏肝脏血管系统的毒素,同样的剂量,对鱼类可以无显著影响,但对哺乳动物却可以是致命的!需要指出的是,迄今为止,人们对MC在动物体内的代谢过程知之甚少。由于环肽对酶降解稳定(Sewald and Jakubke 2002),故MC在哺乳动物体内的代谢可能十分有限。

本书旨在“抛砖引玉”，希望尽绵薄之力，促进科学界和社会公众对蓝藻毒素(或类似的天然毒素)、水产品食用安全性、水环境与人类健康等问题给予更多的关注和重视。最后，热忱欢迎和衷心感谢各位同仁和读者对本书的评论、批评和建议。

谢 平

2006年3月31日于武汉



# 目 录

前言	
第一章 微囊藻毒素概论	1
一、MC 的化学结构	1
二、产毒蓝藻与 MC 的毒性	3
三、MC 的化学性质	8
四、环境因子对 MC 稳定性的影响	11
五、MC 致毒的分子机制	19
第二章 动物体内 MC 的萃取与检测技术	24
一、动物体内 MC 的萃取技术	24
二、动物体内 MC 的纯化技术——固相萃取	29
三、动物体内 MC 含量的分析技术	37
第三章 鱼类对 MC 摄取和清除的实验研究	47
一、鱼类实验研究背景分析	47
二、放射性同位素标记法	51
三、MMPB 法和甲醇萃取法的比较	59
四、甲醇可萃取 MC 的测定	61
第四章 自然水体中 MC 在鱼体内的生物累积	79
一、巴西 Jacarepagua 湖中的红胸罗非鱼体内 MC 含量的季节变化	79
二、巴西 Sepetiba 湾中鱼、蟹和虾体内 MC 含量的季节变化	81
三、埃及鱼池中尼罗罗非鱼体内的 MC 含量	82
四、葡萄牙淡水水体中鱼体内的 MC 含量	83
五、中国巢湖不同营养级鱼体内的 MC 含量	84
六、荷兰 IJsselmeer 湖中不同食性鱼类肝脏中的 MC 含量	87
七、自然水体中鱼体内最大 MC 含量的比较	87
第五章 软体动物对 MC 摄取和清除的实验研究	91
一、软体动物实验研究背景	91
二、海产紫贻贝对 MC 的摄取和清除规律	94
三、海产贻贝对 MC 的摄取和清除规律	99
四、淡水无齿蚌 <i>Anodonta cygnea</i> 对 MC 的摄取和清除规律	100
五、淡水无齿蚌 <i>Anodonta grandis simpsoniana</i> 对 MC 的摄取和清除规律	103

六、淡水圆顶珠蚌 <i>Unio douglasiae</i> 在不同温度条件下对 MC-LR 的摄取和清除规律 .....	106
七、斑纹蚌 <i>Dreissena polymorpha</i> 对 MC-LR 的摄取和清除规律 .....	107
八、淡水田螺 <i>Sinotaia histrica</i> 对 MC-LR 的摄取和清除规律 .....	109
九、不同实验研究中软体动物体内最大 MC 含量的比较 .....	111
<b>第六章 自然水体中 MC 在软体动物体内的生物累积</b> .....	<b>112</b>
一、海洋蚌体内 MC 存在的首次报道 .....	112
二、淡水蚌体中 MC 存在的首次报道 .....	113
三、日本 Suwa 湖中 3 种蚌肝胰腺中 MC 的季节变动规律 .....	116
四、中国太湖 4 种蚌类各种器官中 MC 含量的变化 .....	118
五、荷兰 IJsselmeer 湖斑纹蚌体内的 MC 含量的季节变化 .....	122
六、加拿大湖泊营养水平对 3 种螺类组织中 MC 含量的影响 .....	123
七、日本琵琶湖淡水田螺 <i>Sinotaia histrica</i> 肝胰腺和肠道中 MC 含量的季节变动 .....	126
八、中国巢湖铜锈环棱螺各组织中 MC 含量的季节变化 .....	127
九、自然水体中各种软体动物体内最大 MC 含量比较 .....	127
<b>第七章 MC 在虾蟹体内的生物累积</b> .....	<b>132</b>
一、MC 对卤虫的急性接触毒性实验 .....	132
二、有毒底栖丝状蓝藻对美国小龙虾影响的实验研究 .....	133
三、克氏原螯虾对 MC 摄取和清除的实验研究 .....	134
四、巢湖秀丽白虾、日本沼虾和克氏原螯虾 各组织中的 MC 累积 .....	136
五、用 MMPB 法和甲醇萃取法测定珍宝 蟹幼蟹组织中的 MC-LR 含量 .....	140
<b>第八章 药代动力学简介及 MC 在水生动物体内的药代动力学过程</b> .....	<b>142</b>
一、药代动力学简介 .....	142
二、MC 在水生动物体内的动力学研究 .....	148
<b>第九章 水生动物体内 MC 生物累积的一般模式</b> .....	<b>152</b>
一、MC 进入水生动物体内的主要途径 .....	152
二、MC 在水生动物器官中的分布规律 .....	154
三、动物体内 MC 与食物中 MC 含量的关系 .....	155
四、MC 在浮游植物和碎屑食性水生动物体内的生物累积 .....	157
五、MC 在不同营养级水生动物体内的生物放大作用 .....	160
六、MC 的理化参数与生物浓缩和放大 .....	164
<b>第十章 MC 对人类健康的危害</b> .....	<b>166</b>
一、与蓝藻水华和毒素有关的人类健康事件 .....	166
二、澳大利亚 Malpas 水库饮用水源有毒蓝藻污染 对人类健康的影响 .....	167

三、巴西 Caruaru 透析中心的致命 MC 中毒事件 .....	170
四、人类是否比水生动物对 MC 更加脆弱? .....	172
五、MC 致哺乳动物和鱼类死亡的组织病理学特征 .....	175
六、为何陆生哺乳动物比水生动物对 MC 更加脆弱? .....	176
七、小白鼠和鱼类肝脏对放射性同位素标记的 MC 吸收和 清除速率比较 .....	177
八、不同动物类群循环系统的进化与血压 .....	177
九、MC 对人类健康的风险评价 .....	181
<b>主要参考文献</b> .....	<b>186</b>
<b>作者简介</b> .....	<b>188</b>



# Contents

## Preface

Chapter 1	A general Introduction to Microcystin (MC)	1
1.	Chemical structure of MC	1
2.	Toxin-producing cyanobacteria and the toxicity of MC1	3
3.	Chemical properties of MC	8
4.	Effects of environmental factors on the stability of MC	11
5.	Molecular basis for the toxicity of MC	19
Chapter 2	Extraction and Detection of MC in Animal Tissues	24
1.	Extraction of MC in animal tissues	24
2.	Solid-phase extraction (SPE) for purification of MC in animal tissues	29
3.	Detection of MC in animal tissues	37
Chapter 3	Uptake and Depuration of MC by Fish under Experimental Conditions	47
1.	Background of experimental studies on fish	47
2.	Use of radiolabeled MC	51
3.	A comparison of MMPB and methanol extraction methods (Atlantic salmon)	59
4.	Detection of methanol extractable MC	61
Chapter 4	Bioaccumulation of MC in Fish from Natural Waters	79
1.	Seasonal changes of MC contents in the redbreast tilapia from the Jacarepagua Lagoon, Brazil	79
2.	Seasonal changes of MC contents in fish, crab and shrimps from Sepetiba Bay, Brazil	81
3.	MC contents in the Nile tilapia ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) from an Egyptian fish farm	82
4.	MC contents in fish from Portuguese freshwaters	83
5.	MC contents in fish with different trophic levels in Lake Chaohu, China	84
6.	MC contents in the liver of fish with different feeding habits in Lake IJsselmeer, Netherlands	87
7.	A comparison of the maximum MC contents in fish from natural waters	87

Chapter 5	Uptake and Depuration of MC by Mollusks under Experimental Conditions .....	91
1.	Background of experimental studies on mollusks .....	91
2.	Uptake and depuration of MC by the marine bivalve <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....	94
3.	Uptake and depuration of MC by the marine bivalve <i>Mytilus edulis</i> .....	99
4.	Uptake and depuration of MC by the freshwater bivalve <i>Anodonta cygnea</i> ..	100
5.	Uptake and depuration of MC by the freshwater bivalve <i>Anodonta grandis simpsoniana</i> .....	103
6.	Uptake and depuration of MC by the freshwater bivalve <i>Unio douglasiae</i> under different temperatures .....	106
7.	Uptake and depuration of MC by the bivalve <i>Dreissena polymorpha</i> .....	107
8.	Uptake and depuration of MC by the snail <i>Sinotaia histrica</i> .....	109
9.	A comparison of the maximum MC contents in mollusks in different experimental studies .....	111
Chapter 6	Bioaccumulation of MC in Mollusks from Natural Waters .....	112
1.	The first report to identify MC in marine bivalves .....	112
2.	The first report to identify MC in freshwater bivalves .....	113
3.	Seasonal dynamics of MC in the hepatopancreas of three bivalves in Lake Suwa, Japan .....	116
4.	Changes of MC in various organs of four bivalves in Lake Taihu, China .....	118
5.	Seasonal dynamics of MC in the bivalve <i>Dreissena</i> in Lake IJsselmeer, Netherlands .....	122
6.	Influences of trophic status on the occurrence of MC in the tissues of three snails in Canadian lakes .....	123
7.	Seasonal dynamics of MC in the hepatopancreas and intestines of the snail <i>Sinotaia histrica</i> in Lake Biwa, Japan .....	126
8.	Seasonal dynamics of MC in the snail <i>Bellamya aeruginosa</i> in Lake Chaohu, China .....	127
9.	A comparison of the maximum MC contents in various mollusks from natural water bodies .....	127
Chapter 7	Bioaccumulation of MC in Shrimps and Crayfish .....	132
1.	Experimental studies on the acute contact toxicity of MC to brine shrimp ..	132
2.	Experimental studies on the effects of toxic benthic filamentous cyanobacteria on the signal crayfish ( <i>Pacifastacus leniusculus</i> ) .....	133

3. Experimental studies on the accumulation and depuration of MC by the crayfish <i>Procambarus clarkia</i> .....	134
4. Accumulation of MC in various organs of the shrimps <i>Palaemon modestus</i> and <i>Macrobrachium nipponensis</i> and the crayfish .....	136
5. Detection of MC-LR in the Dungeness crab ( <i>Cancer magister</i> ) larvae by both MMPB and methanol extraction methods .....	140
<b>Chapter 8 A Brief Introduction to Pharmacokinetics and the Pharmacokinetic Process of MC in Aquatic Animals .....</b>	<b>142</b>
1. A brief introduction to pharmacokinetics .....	142
2. Studies on the kinetics of MC in aquatic animals.....	148
<b>Chapter 9 General Patterns of Bioaccumulation of MC in Aquatic Animals .....</b>	<b>152</b>
1. Major routes of exposure to MC in aquatic animals.....	152
2. Distribution of MC in various organs of aquatic animals.....	154
3. Relationship between MC contents of animal tissues and food .....	155
4. Bioaccumulation of MC in aquatic animals feeding on phytoplankton and detritus .....	157
5. Biomagnification of MC in aquatic animals with different trophic levels .....	160
6. Relationships between physicochemical parameters of MC and bioconcentration and biomagnification of MC in organisms.....	164
<b>Chapter 10 Harmful Effects of MC on Human Health .....</b>	<b>166</b>
1. Human health incidents associated with cyanobacteria and cyanotoxins.....	166
2. Short-term effects of drinking water pollution by toxic cyanobacteria on human health in Malpas Dam of Australia.....	167
3. Fatal MC intoxication in a haemodialysis centre in Caruaru, Brazil.....	170
4. Are humans more vulnerable to MC than aquatic animals?.....	172
5. Histopathological features of fatal MC intoxication in mammals and fish ..	175
6. Why are terrestrial mammals more vulnerable to MC than aquatic animals? .....	176
7. A comparison of the uptake and depuration rates of radiolabeled MC in livers of mice and fish .....	177
8. Evolution of circulatory systems and blood pressure in various animals.....	177
9. Risk assessment of MC on human health.....	181

## References



# 第一章 微囊藻毒素概论

微囊藻毒素(microcystin, MC)的结构于 20 世纪 80 年代初被确认(Botes et al. 1984, 1985), 因为这类化合物首先从一种蓝藻——铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)中分离得到, 因而被命名为“microcystin”(Carmichael et al. 1988)。MC 在结构上是一种环肽, 迄今为止已有 75 种以上的 MC 被确认(Svrcek and Smith 2004), 在对动物的毒性方面, 其主要靶器官为肝脏。MC 对哺乳动物的毒性很强, 主要是强烈抑制两种蛋白磷酸酶(PP1 和 PP2A)的活性(Yoshizawa et al. 1990)。

## 一、MC 的化学结构

MC 是一类结构上有联系的单环七肽化合物, 其一般结构如图 1-1 所示。MC 的结构特征是其具有一个被称为 Adda 的特殊的 20 碳 $\beta$ -氨基酸([2S, 3S, 8S, 9S]-3-氨基-9-甲氧基-2,6,8-三甲基-10-苯基癸-4,6-二烯酸)([2S,3S,8S,9S]-3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid)。此外, MC 还含有 3 个 D 型氨基酸-丙氨酸(alanine)、MeAsp(也称为 Masp)(赤- $\beta$ -甲基天冬氨酸, erythro- $\beta$ -methylaspartic acid)和谷氨酸(glutamic acid)、Mdha(*N*-甲基脱氢丙氨酸, *N*-methyldehydroalanine)和两个可变的 L-氨基酸(McElhiney and Lawton 2005)。

虽然 MC 的结构变异在 7 个氨基酸都能发生, 但最常见的变异主要是发生在 2、4 号位上的两个可变 L-氨基酸(图 1-1 中的 X 和 Z), 以及 MeAsp 和 Mdha 残基的甲基化模式(Sivonen and Jones 1999)。MC 的命名也是根据 2、4 号位上的两个可变氨基酸而得, 例如, 最常见的 MC-LR 在可变氨基酸位置含有亮氨酸(leucine)和精氨酸(arginine), 分子质量为 994 Da。

在有机化学中, 根据氨基和羧基的相对位置将氨基酸分为 $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -等氨基酸; 将其他化合物与甘油醛进行比较, 若 Fisher 投影式中手性碳上的取代基在碳链右边, 称该化合物为 D 型, 反之称为 L 型。天然的蛋白质氨基酸主要是 $\alpha$ -氨基酸, 而 $\beta$ -氨基酸和 $\gamma$ -氨基酸很少见; 此外, 天然的蛋白质氨基酸都是 L 型(荣国斌和苏克曼 2000)。很显然, MC 主要是由非蛋白源性氨基酸构成。迄今为止, Adda 仅发现存在于 MC 和与其在结构上有联系的肝毒素——五肽节球藻毒素(pentapeptide nodularin)中(Rinehart et al. 1994)。

由于肽类在人体内易与口腔、胰腺溶酶体内的蛋白质水解酶作用而迅速降解, 随即被肝脏处理排出(因此生物利用率低、半衰期短), 在肽类药物合成中, 常通过化学修饰(如环化、引入 D-氨基酸、 $N^{\alpha}$ -烷基化氨基酸、 $C^{\alpha}$ -双烷基化氨基酸等)

提高肽类药物在体内的稳定性(Sewald and Jakubke 2002)。从 MC 的环状结构以及主要由 D 型和特殊氨基酸组成的特点推测, MC 可能比蛋白质源性多肽在动物体内具有更高的代谢稳定性。

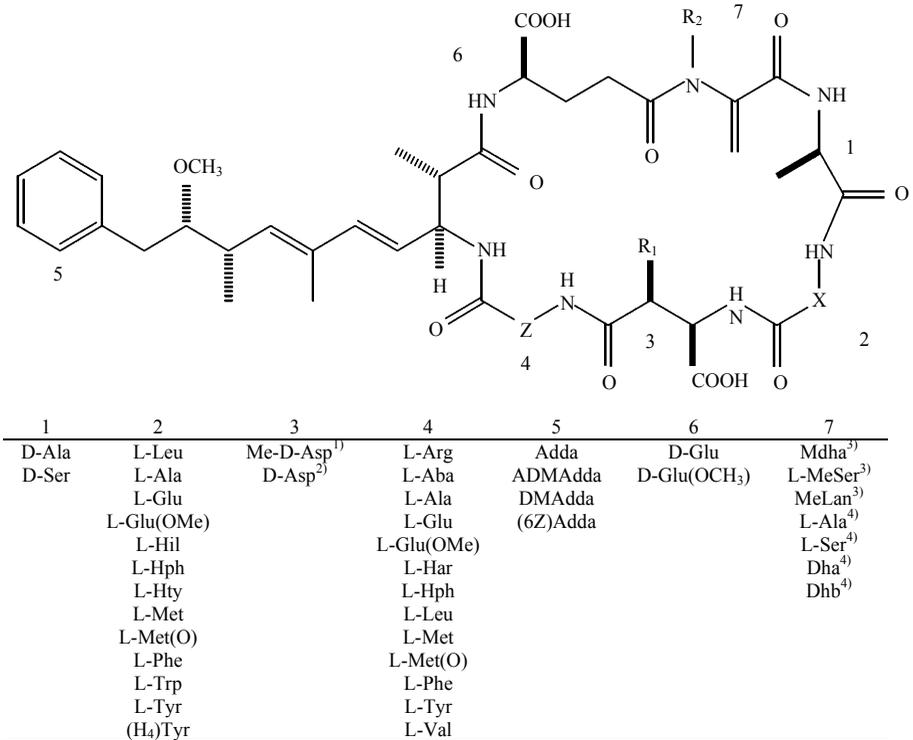


图 1-1 微囊藻毒素的一般结构: 环(D-丙氨酰<sup>1</sup>-X<sup>2</sup>-D-MeAsp<sup>3</sup>-Z<sup>4</sup>-Adda<sup>5</sup>-D-谷氨酰<sup>6</sup>-Mdha<sup>7</sup>)。

D-MeAsp 为 D-赤-β-甲基天冬氨酸(引自 McElhiney and Lawton 2005)

Aba=氨基异丁酸; ADMAdda= O-乙酰基-O-去甲氧基 Adda; Dha=脱氢丙氨酸; Dhb=脱氢酪氨酸; DMAAdda= O-去甲氧 Adda; Me-D-Asp=赤-β-甲基-D-天冬氨酸; Glu(OMe)= 谷氨酸甲酯; (H<sub>4</sub>)Tyr=1, 2, 3, 4-四氢酪氨酸; Har=高精氨酸; Hil=高异亮氨酸; Hph=高苯丙氨酸; Hty=高酪氨酸; Mdha=N-甲氧基脱氢丙氨酸; MeLan=N-甲基羊毛硫氨酸; Met(O)= 蛋氨酸-S-氧; MeSer=N-甲基丝氨酸; (6Z)Adda= Adda 在 Δ<sup>6</sup> 双键处的立体异构体。1)R<sub>1</sub>=Me, 2)R<sub>1</sub>=H, 3)R<sub>2</sub>=Me, 4)R<sub>2</sub>=H

Fig. 1-1 General structure of MC: cyclo-(D-Ala<sup>1</sup>-X<sup>2</sup>-D-MeAsp<sup>3</sup>-Z<sup>4</sup>-Adda<sup>5</sup>-D-Glu<sup>6</sup>-Mdha<sup>7</sup>), with a list of some of the reported structural variations. D-MeAsp is D-erythro-β-methylaspartic acid (Cited from McElhiney and Lawton 2005)

Aba = aminoisobutyric acid; ADMAdda = O-acetyl-O-demethyl Adda; Dha = dehydroalanine; Dhb = dehydrobutyrine; DMAAdda = O-demethyl Adda; Me-D-Asp = erythro-β-methyl-D-aspartic acid; Glu(OMe) = glutamic acid methyl ester; (H<sub>4</sub>)Tyr = 1,2,3,4-tetrahydrotyrosine; Har = homoarginine; Hil = homoisoleucine; Hph = homophenylalanine; Hty = homo-tyrosine; Mdha = N-methyl dehydroalanine; MeLan = N-methylanthionine; Met(O) = methionine-S-oxide; MeSer = N-methylserine; (6Z)Adda = stereoisomer of Adda at the Δ<sup>6</sup> double bond. 1) R<sub>1</sub> = Me; 2) R<sub>1</sub> = H; 3) R<sub>2</sub> = Me; 4) R<sub>2</sub> = H

在有机化学中，烯烃碳碳双键 C1 和 C2 上原子序数大的原子或原子团在双键平面同一侧时，称为 Z 构型，在异侧时为 E 构型。Adda 残基中的 C6 双键有扩展的反式构型(E 构型)和顺式构型(Z 构型)两种，已从自然水体的水华蓝藻中确认并分离得到 MC-LR 和 MC-RR 的两种几何异构体(Harada et al. 1990a, b, 吴冬辉等 1994)，以反式构型(E 构型)为主(Tsuji et al. 1994)。

大量的研究报道了 MC 在淡水和咸淡水环境中的存在(Dawson and Holmes 1999)，只有少数报道 MC 存在于海洋环境(Andersen et al. 1993, Chen et al. 1993, Williams et al. 1997b)。

## 二、产毒蓝藻与 MC 的毒性

MC 是一类由蓝藻产生的天然毒素，这些蓝藻包括 *Microcystis*、*Anabaena*、*Planktothrix*、*Anabaenopsis*、*Nostoc Aphanocapsa* 和 *Hapalosiphon*(图 1-2)(Carmichael 1992, Skulberg et al. 1993, Svrcek and Smith 2004)。MC 属于蓝藻的次生代谢产物(secondary metabolite)，因为它们并不用于主要的代谢过程(如细胞分裂和产能)(Svrcek and Smith 2004)。在产 MC 的蓝藻类群中，有些能产多种蓝藻毒素(表 1-1)，这样使根据生物类群来判断毒素种类变得困难。

虽然迄今为止人们还未能确切地知道为何蓝藻要产毒素以及在什么环境条件下产毒素，但 MC 的合成途径已经比较清楚，其较小的分子质量、环状结构以及含有特异性的氨基酸表明这些肽类是非核糖体(non-ribosomae)途径合成的(Meissner et al. 1996, Dittmann et al. 1997)。而非核糖体肽类合成酶(peptide synthetase)在结构上高度保守，这些肽类合成酶的基因编码是组件式的(modular)，每个基因模块(module)含有单个肽合成酶单元(peptide synthetase unit)，因此一个藻株的产毒能力可能主要取决于是否具有这些基因以及它们在特定环境下的表达(Hitzfeld et al. 2000)。

MC 与许多人工合成的有机污染物不同，只要水体中有产毒蓝藻存在，它就可以产生，只是当它们很微量时，不会对人类和其他水生动物产生明显的毒害作用；而当水体严重富营养化时，产毒蓝藻往往大量暴发(常常形成厚厚的蓝藻水华，如图 1-3 和图 1-4)，MC 会源源不断地产生并被大量释放到水体中。

水体中的蓝藻水华可由一至数个优势种组成(其中一些可能产毒)，即使是由单一种类形成的水华，也可能是有毒株和无毒株的混合体，已知的蓝藻水华中有 60%~70% 含有毒株(Fawell et al. 1993, Sivonen and Jone 1999, Svrcek and Smith 2004)。在某一个期间的水华可产生几种 MC，在一些情况下甚至可达 20 多种；一种蓝藻水华的毒性取决于有毒株细胞的浓度，以及所出现的毒素的相对毒性(Svrcek and Smith 2004)。已报道的从自然水体中采集的水华蓝藻中的 MC 含量，以中国的 7300  $\mu\text{g/g DW}$ (Zhang et al. 1991)和葡萄牙的 7100  $\mu\text{g/g DW}$ (Vasconelos et

al. 1996)为最高。

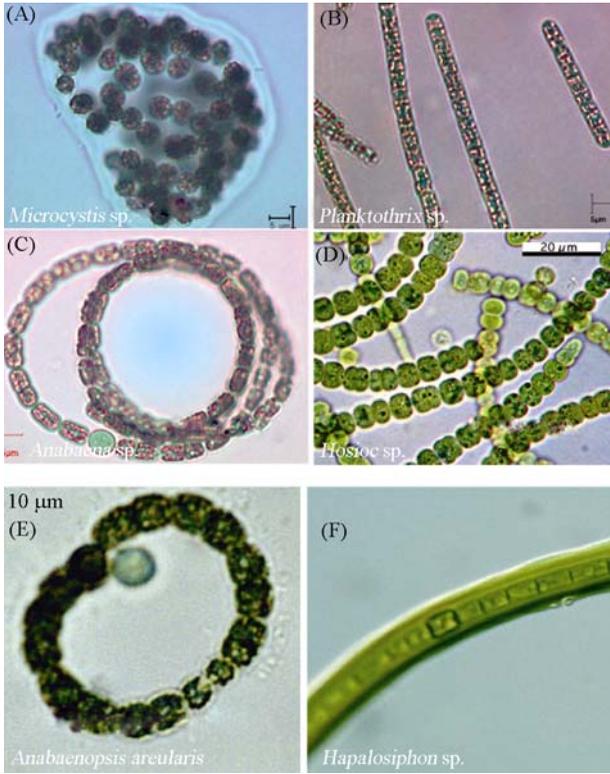


图 1-2 产 MC 的蓝藻(A~C 引自 Briand et al. 2003, D 引自 CSIC, [www.ibvf.cartuja.csic.es/Cultivos/Seccion\\_IV.htm](http://www.ibvf.cartuja.csic.es/Cultivos/Seccion_IV.htm), E 引自 Cyanosite, <http://www.cyanosite.bio.purdue.edu/images/images.html>, F 引自 Protist Information Server, <http://protist.i.hosei.ac.jp/pdb/Images/Prokaryotes>)

Fig. 1-2 Species of cyanobacteria that generate MC (A~C are cited from Briand et al. 2003, D from CSIC, [www.ibvf.cartuja.csic.es/Cultivos/Seccion\\_IV.htm](http://www.ibvf.cartuja.csic.es/Cultivos/Seccion_IV.htm), E from Cyanosite, <http://www.cyanosite.bio.purdue.edu/images/images.html>, and F from Protist Information Server, <http://protist.i.hosei.ac.jp/pdb/Images/Prokaryotes>)

表 1-1 蓝藻毒素的名称及产毒生物  
Table 1-1 Cyanotoxin name and producer organisms

毒素类别 Toxic group	毒性或刺激效应 Toxic or irritant effect	产毒蓝藻属名 Producer cyanobacteria genera
环肽 Cyclic peptides		
微囊藻毒素 Microcystin	肝毒性 Hepatotoxic	鱼腥藻 <i>Anabaena</i> , 项圈藻 <i>Anabaenopsis</i> , 隐球藻 <i>Aphanocapsa</i> , 陆生软管藻 <i>Hapalosiphon</i> , 微囊藻 <i>Microcystis</i> , 念珠藻 <i>Nostoc</i> , 颤藻 <i>Oscillatoria</i>

毒素类别 Toxic group	毒性或刺激效应 Toxic or irritant effect	产毒蓝藻属名 Producer cyanobacteria genera
节球藻毒素 Nodularin	肝毒性 Hepatotoxic	节球藻(主要在咸淡水) <i>Nodularin</i> (mainly brackish water)
生物碱 Alkaloids		
神经毒性生物碱 Neurotoxic alkaloids		
类毒素-a Anatoxin-a	神经毒性 Neurotoxic	鱼腥藻 <i>Anabaena</i> , 束丝藻 <i>Aphanizomenon</i> , 颤藻 <i>Oscillatoria</i>
拟类毒素-a(s) Anatoxin-a(s)	神经毒性 Neurotoxic	鱼腥藻 <i>Anabaena</i> , 颤藻 <i>Oscillatoria</i>
石房蛤毒素 Saxitoxin	神经毒性 Neurotoxic	鱼腥藻 <i>Anabaena</i> , 束丝藻 <i>Aphanizomenon</i> , 拟 柱胞藻 <i>Clindrospermopsis</i> , 鞘丝藻 <i>Lyngbya</i>
细胞毒性的生物碱 Cytotoxic alkaloid		
拟柱胞藻毒素 Cylindrospermopsin	细胞毒性 Cytotoxic 肝毒性 Hepatotoxic 神经毒性 Neurotoxic 遗传毒性 Genotoxic	鱼腥藻 <i>Anabaena</i> , 束丝藻 <i>Aphanizomenon</i> , 拟 柱胞藻 <i>Clindrospermopsis</i> , <i>Umezakia</i>
皮炎毒性生物碱 Dermatotoxic alkaloid		海洋蓝藻 <i>Marine cyanobacteria</i>
海兔毒素 Aplysiatoxin	皮炎毒性 Dermatotoxic	鞘丝藻 <i>Lyngbya</i> , 裂须藻 <i>Schizothrix</i> , 颤藻 <i>Oscillatoria</i>
鞘丝藻毒素 Lyngbyatoxin-a	皮炎毒性 Dermatotoxic 口腔和肠胃发炎 Oral and gastrointestinal inflam- mation	鞘丝藻 <i>Lyngbya</i>
脂多糖内毒素 Lipopolysaccharides (LPS)	具有刺激任何暴露组织的可能 Potentially irritates any exposed tissue	所有 All

(引自 Svrcek and Smith 2004) (Cited from Svrcek and Smith 2004)



图 1-3 中国滇池、太湖和巢湖的蓝藻水华

Fig. 1-3 Occurrence of dense cyanobacterial surface blooms in Lakes Dianchi, Taihu and Chaohu, China

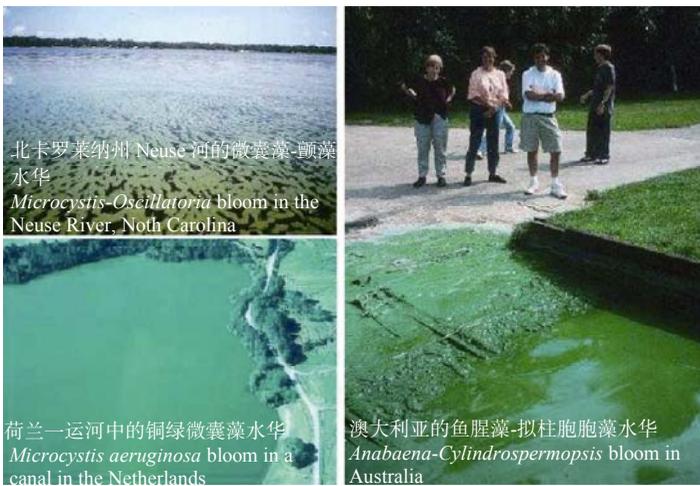


图 1-4 世界各地的蓝藻水华(引自 Paerl et al. 2001)

Fig. 1-4 Worldwide occurrence of dense cyanobacterial surface blooms  
(Cited from Paerl et al. 2001)

虽然 MC 还未达到用于制造大规模杀伤性生物武器(mass casualty biological weapon, MCBW)的程度(由于生产困难、毒性还不是足够强烈),但其毒性已经达到引起军事专家关注的程度(表 1-2)。一些神经毒素能有效地终止神经和肌肉的功能而不引起组织显微结构的破坏,而其他一些毒素直接破坏和损伤组织,对这些毒素,预防十分重要,因为常常在几分钟或数小时内就可发生不可逆的病理变化,MC 就属于这种类型。MC 能够专一性地与肝细胞内的蛋白磷酸酶结合,而不损伤体内的其他细胞,除非肝细胞对 MC 的吸收被阻断。在致死剂量暴露的情况下,15~60 min 之内即发生不可逆的器官损伤,在这种情况下,具有重要的生理功能的肝脏被严重损伤,致使治疗可能作用甚微或毫无价值;由于许多毒素影响体细胞、组织和器官的基础代谢过程,阻止毒素的药物也常常会带来复杂的毒副作用,而用来保护实验动物免受 MC 毒害的利福平(rifampin, 抗结核病药)对人却是安全的(Franz 1997)。

表 1-2 所选的毒素与化学毒剂对实验小白鼠致死性的比较

Table 1-2 Comparative lethality of selected toxins and chemical agents in laboratory mice

试剂 Agent	LD <sub>50</sub> /(μg/kg)	相对分子质量 Molecular weight	来源 Source
肉毒菌毒素 Botulinum Toxin	0.001	150 000	细菌 Bacterium
志贺毒素 Shiga Toxin	0.002	55 000	细菌 Bacterium
破伤风毒素 Tetanus Toxin	0.002	150 000	细菌 Bacterium
相思子豆毒素 Abrin	0.04	65 000	植物(相思豆) Plant (Rosary Pea)

试剂 Agent	LD <sub>50</sub> /(μg/kg)	相对分子质量 Molecular weight	来源 Source
白喉毒素 Diphtheria Toxin	0.10	62 000	细菌 Bacterium
刺尾鱼毒素 Maitotoxin	0.10	3400	海洋鞭毛类 Marine dinoflagellate
岩沙海葵毒素 Palytoxin	0.15	2700	海洋软珊瑚 Marine soft coral
雪卡毒素 Ciguatoxin	0.40	1000	鱼/海洋双鞭毛类 Fish/Marine dinoflagellate
组织毒素 Textilotoxin	0.60	80 000	毒蛇 Elapid snake
产气荚膜梭菌毒素 <i>Clostridium perfringens</i> toxin	0.1~5.0	35 000~40 000	细菌 Bacterium
哥伦比亚箭毒蛙毒素 Batrachotoxin	2.0	539	箭毒蛙 Arrow-Poison Frog
蓖麻毒素 Ricin	3.0	64 000	植物(蓖麻子) Plant (Castor Bean)
海蜗牛毒素 Conotoxin	5.0	1500	海蜗牛 Cone Snail
泰攀蛇毒素 Taipoxin	5.0	46 000	毒蛇 Elapid Snake
河豚毒素 Tetrodotoxin	8.0	319	河豚 Puffer Fish
蝎毒素 Tityustoxin	9.0	8000	蝎子 Scorpion
石房蛤毒素 Saxitoxin	10.0(吸入 Inhal, 2.0)	299	海洋双鞭毛类 Marine dinoflagellate
VX 神经毒剂 VX never agent	15.0	267	化学毒剂 Chemical agent
葡萄球菌肠毒素 B (Rhesus/Aerosol)	27.0(半数有效 剂量 ED <sub>50</sub> -pg)	28 494	细菌 Bacterium
拟类毒素-A(s) Anatoxin-A(s)	50.0	500	蓝藻 Blue-Green Alga
微囊藻毒素-LR Microcystin-LR	50.0	994	蓝藻 Blue-Green Alga
索曼毒剂(GD) Soman (GD)	64.0	182	化学毒剂 Chemical Agent
沙林毒气(GB) Sarin (GB)	100.0	140	化学毒气 Chemical Agent
乌头碱 Aconitine	100.0	647	植物(乌头) Plant (Monkshood)
T-2 毒素 T-2 Toxin	1210.0	466	真菌毒素 Fungal Mycotoxin

(引自 Franz 1997)(Cited from Franz 1997)

由于大多数 MC 是亲水的,一般不能直接穿过脊椎动物的细胞膜,因此需要 ATP 依赖性的转运蛋白(ATP-dependent transporter)来吸收,一个还未被确认的多种有机阴离子转运蛋白或胆汁酸转运蛋白(bile acid transporter)被认为是大白鼠肝脏中这些环肽的载体(carrier)(Runnegar et al. 1981, 1982, Eriksson et al. 1990a), 因此, MC 的毒性

限于像肝脏这样其细胞膜含有有机阴离子转运蛋白的器官(Hitzfeld et al. 2000)。

### 三、MC 的化学性质

有机污染物的物理化学性质(如水溶解度、蒸气压、挥发性、在水中的稳定性、光降解速率、酸碱解离常数、辛醇-水分配系数等)影响着它们在环境中的分配、吸附、生物富集及毒性等。一般来说,有机化合物的物理化学数据可在严格的实验条件下测得,这些数据一般在新化合物注册时是必需的。然而,由于 MC 为天然产物,且一般能获得的标样量很少且价格昂贵,所以有关其物理化学性质方面的研究很少(Rivasseau et al. 1998)。

在对 MC 的物理化学性质的研究中,以对 MC-LR(图 1-5)的研究最多。MC-LR 含有两个可解离的羧基(ionizable carboxyl group)和一个可解离的氨基(ionizable amino group),它们未参与形成构成环肽结构的肽键(Rudolph-Böhner et al. 1994)。由于羧基既是很强的 H 受体,也是很强的 H 供体,即羧基的存在将显著提高化合物的水溶解度;氨基也会参与氢键的形成,可作为 H 供体(Schwarzenbach et al. 2003),因此可以推测 MC-LR 具有很好的水溶性。

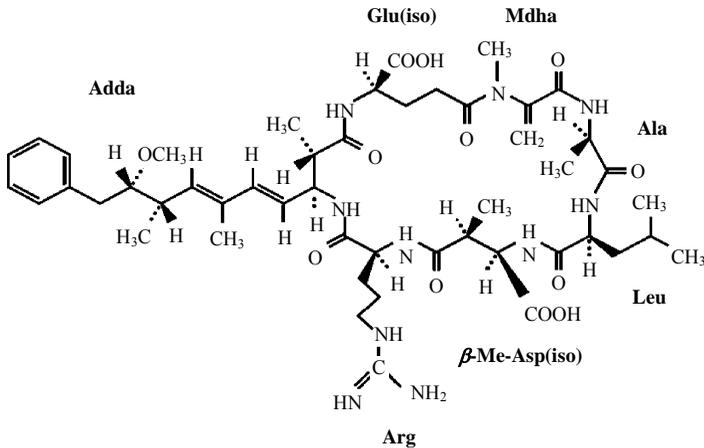


图 1-5 MC-LR 的结构(修改自 Carmichael 1994)

Fig. 1-5 Structure of MC-LR (Modified from Carmichael 1994)

#### 1. 水溶解度

有机化合物在水相的平衡浓度(或饱和浓度)称为化合物的水溶解度。由于很难得到大量的 MC 纯品,通过向一定体积水中不断添加 MC 直至饱和以及出现可见的沉淀来测定溶解度的方法是很困难的。Rivasseau 等(1998)通过间接的方法进行了估算:在 25°C 的条件下,将超纯水加入装有已知量的 MC-LR 的微小样瓶(microvial)中,再通过色谱峰面积估算溶解量,并用甲醇作为参照来进行校正;在

2 g/L 的理论浓度下,有(90±3)% MC-LR 溶解在水中,在 1 g/L 的浓度下,有(96±3)% MC-LR 溶解在水中;虽然无法得出一个准确的溶解度值,但可以推测,MC-LR 在水中的溶解度大于 1 g/L。

## 2. MC-LR 的酸碱解离常数

关于酸碱性质(化合物与环境中的水之间的酸碱相互作用),主要表现在化合物的解离常数  $K_a$  或  $K_b$  上。根据游离氨基酸的测定数据,MC-LR 中 3 个可解离基团(2 个羧基和 1 个氨基)的  $pK_a$  值(阳离子和阴离子各占一半时的 pH)分别为 2.09、2.19 和 12.48(Chang 1981);但这些  $pK_a$  值可能与结合在肽键中的氨基酸的值稍有差异(De Maagd et al. 1999)。依据这些  $pK_a$  值,可推测出不同 pH 环境中 MC-LR 的优势形态如表 1-3 所示。

表 1-3 不同 pH 下 MC-LR 的优势形态  
Table 1-3 Dominant species of MC-LR at different pH-value

pH	优势形态 Dominant species	静电荷 Net charge of MC-LR
pH<2.09	$(COOH)_2(NH_2^+)$	+
2.09<pH<2.19	$(COO^-)(COOH)(NH_2^+)$	0
2.19<pH<12.48	$(COO^-)_2(NH_2^+)$	-
pH > 12.48	$(COO^-)_2(NH)$	-

(引自 De Maagd et al. 1999)(Cited from De Maagd et al. 1999)

一种化合物在  $C_{18}$  柱(octadecylsilica, ODS)上的保留因子  $k_w$ (retention factor)(以水作为洗脱液)可用来估算该化合物的疏水性(hydrophobicity)。Rivasseau 等(1998)通过测定 pH 为 7 时 MC 的  $k_w$ , 估算了 MC 的  $pK_a$  值如表 1-4 所示。由此可见,MC 的羧基的电离 pH 为 3.3~3.4, 在自然环境中的 MC 为中性或带负电荷;根据水溶性和极性作用,MC 易保留在水相中而不易被沉积物或颗粒悬浮物所吸收。

表 1-4 MC 的若干物理化学数据: 外推的  $\log k_w$  和  $pK_a$ , 以及被悬浮颗粒物  
和砂质沉积物所吸附的 MC 的百分比(经过 3 天振荡)( $n=2$ )

Table 1-4 Some physiochemical data for microcystins: extrapolated values of  $\log k_w$ ,  $pK_a$  and percentage of microcystins absorbed on suspended particulate matter or on a sandy sediment (shaken for three days) ( $n=2$ )

毒素 Toxin	$\log k_w$ pH 7	$pK_a$	被颗粒物吸收的量 Absorbed by particles/%	被砂质沉积物吸收的量 Absorbed by sandy sediment/%
MC-LR	4.2±0.3	3.3±0.2	11±2	7±1
MC-RR	4.4±0.3	3.4±0.2	9±3	8±2
MC-YR	3.9±0.2	3.4±0.2	13±2	7±2

(引自 Rivasseau et al. 1998)(Cited from Rivasseau et al. 1998)

### 3. MC-LR 的正辛醇-水分配系数的直接测定

正辛醇是最广泛使用的预测有机化合物在天然有机相和水之间分配的有机溶剂,测定辛醇-水分配系数( $P_{ow}$ )最常用的实验方法与测定水溶解度相似,即采用摇瓶法(限于  $P_{ow} < 10^5$  的化合物)或产生柱法(用于强疏水性化合物)(Schwarzenbach et al. 2003)。

从表 1-3 可见,当 pH 在 2.09~2.19 时,主要是净电荷为零的两性离子(zwitterion with no net charge),这是 MC-LR 最中性(neutral)的形态,该形态也可能最容易分配进入辛醇;而蓝藻可能大量繁殖的 pH 为 6~9,此时  $P_{ow}$  值可能较低(De Maagd et al. 1999)。

De Maagd 等(1999)在 25℃ 的条件下,采用摇瓶法测定了不同 pH 条件下 MC-LR 在辛醇-水中的分配比率的对数值(the log n-octanol: water distribution ratio,  $\log P_{ow}$ )。结果表明,MC-LR 的  $\log P_{ow}$  与 pH 密切相关,即当 pH 从 1 上升到 10 时,  $\log P_{ow}$  逐渐从 2.18 降低到 -1.76(图 1-6),但  $\log P_{ow}$  在羧基的  $pK_a$  值附近并无大的变化。根据表 1-3 和图 1-6 可见,  $(COOH)_2(NH_2^+)$  形态的 MC-LR 比  $(COO^-)_2(NH_2^+)$  形态的 MC-LR 分配进入正辛醇的能力要强得多。

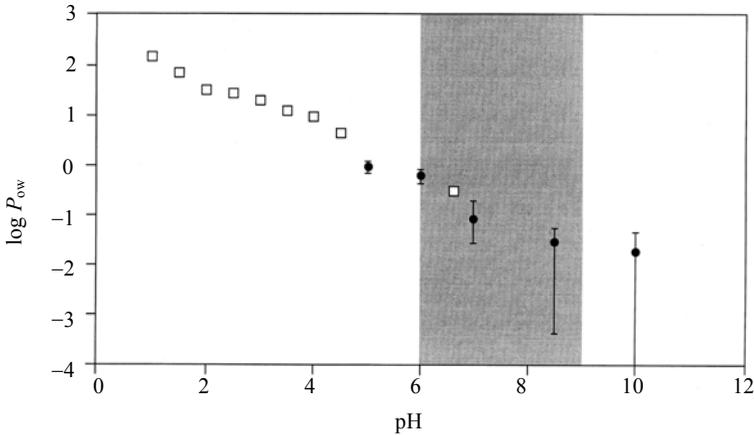


图 1-6 pH 对 MC-LR 的辛醇-水分配比率的对数值( $\log P_{ow}$ )的影响。□一次测定值, ● 3 次测定的平均值及其 95% 置信区间。灰色区域表示蓝藻旺盛繁殖的 pH 范围(引自 De Maagd et al. 1999)

Fig. 1-6 pH-dependent  $\log P_{ow}$  of MC-LR. □ Single measurement. ● Triplicate measurement with 95%-confidence interval. The gray shade shows the range at which cyanobacteria normally flourish (Cited from De Maagd et al. 1999)

### 4. MC-LR、MC-LY、MC-LW 和 MC-LF 的正辛醇-水分配系数的间接测定

Ward 和 Codd(1999)用间接的方式估算了 4 种 MC 的正辛醇-水分配系数:用已知  $\log P_{ow}$ (0.80~4.81)的 8 种化合物作为参照物,用水/乙腈作为流动相进行梯度洗脱

(从 0 到 60% 的乙腈,  $V/V$ ), 建立  $\log P_{ow}$  与保留时间的回归关系(图 1-7), 再在同样的条件下洗脱 MC-LR、MC-LY、MC-LW 和 MC-LF, 依据上述回归关系估算  $\log P_{ow}$  分别为 2.16、2.92、3.46 和 3.56。通过间接法估算的 MC-LR 的  $\log P_{ow}$  值与 De Maagd 等(1999)采用摇瓶法在 pH 为 1 时的直接测定值(2.18)接近。很明显, 对  $\log P_{ow}$  值受 pH 影响很大的 MC 来说, 用间接法估算  $\log P_{ow}$  值时, pH 的设定十分重要。

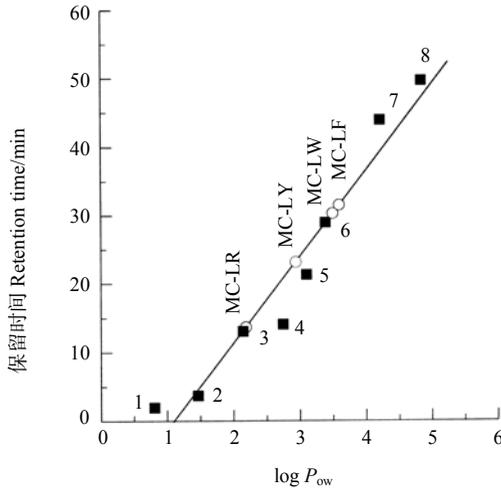


图 1-7 用 HPLC 对 MC-LR、MC-LY、MC-LW 和 MC-LF 的  $\log P_{ow}$  值的估算

用乙腈/水溶液梯度洗脱 waters  $C_{18}$  Nova-Pak HR (5 i.d.  $\times$  100 mm) HPLC 柱上的参照化合物(1~8)。化合物( $\log P_{ow}$ ) 分别是间苯二酚(0.80)、苯酚(1.46)、苯(2.13)、甲苯(2.73)、2,4-二氯酚(3.08)、萘(3.37)、*p, p'*-甲氧滴滴涕和菲(4.81)。

回归曲线为  $y=12.83x-14.21$ ,  $R^2>0.97$ (引自 Ward and Codd 1999)

Fig. 1-7 Estimation of  $\log P_{ow}$  values of MC-LR, MC-LY, MC-LW and MC-LF by HPLC

Reference compounds (1~8) were eluted from a waters  $C_{18}$  Nova-Pak HR (5 i.d.  $\times$  100 mm) HPLC column with a linear gradient of acetonitrile/water. Compounds ( $\log P_{ow}$ ) were 1, resorcinol (0.80); phenol (1.46); benzene (2.13); toluene (2.73); 2,4-dichlorophenol (3.08); naphthalene (3.37); *p, p'*-methoxychlor(4.20) and phenanthrene(4.81). The

regression line ( $y=12.83x-14.21$ ,  $R^2>0.97$ ) is shown(Cited from Ward and Codd 1999)

## 四、环境因子对 MC 稳定性的影响

### 1. pH 和温度对 MC-LR 稳定性的影响

Harada 等(1996a)在实验条件下研究了 pH(1、5、7、9)和温度(5、20、21~30、40 $^{\circ}C$ )对 MC-LR 稳定性的影响。在日本, 夏季蓝藻水华发生时湖水常见的 pH 为 9~10、温度为 25~30 $^{\circ}C$ 。当温度为 5 $^{\circ}C$ 和 20 $^{\circ}C$ 时, 在上述 4 种 pH 条件下 MC-LR 很少分解(图 1-8);当温度为 40 $^{\circ}C$ 时, MC-LR 的半衰期为 3 周(pH 1)或 10 周(pH 9)。而模仿夏季自然条件下的降解速率比 pH 9、温度 40 $^{\circ}C$ 时稍慢。因此, MC 的热力学降解(thermal decomposition)比其他因子的作用小。

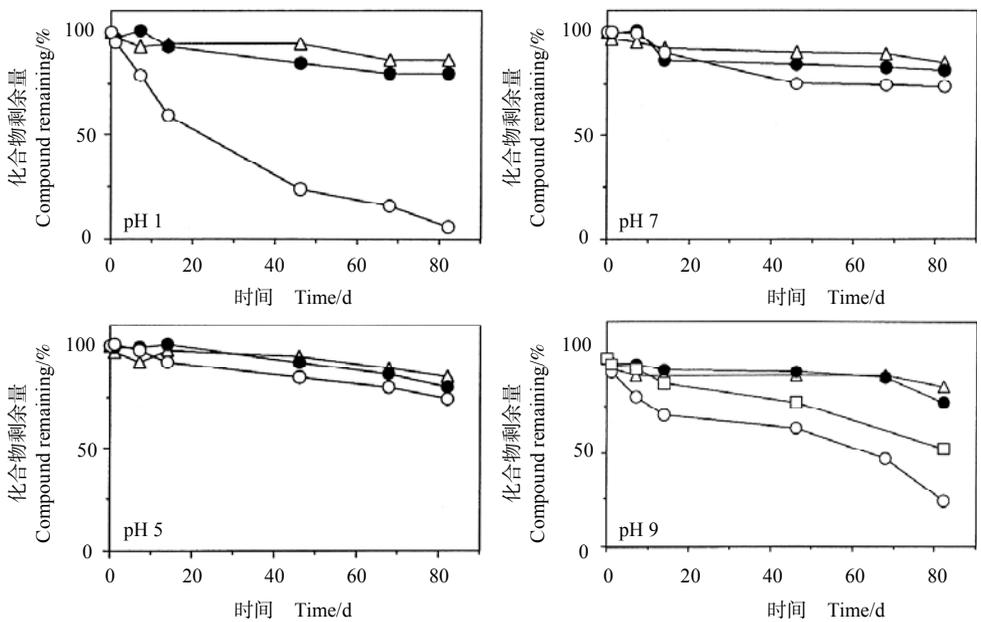


图 1-8 pH 和温度对 MC-LR 的稳定性影响(引自 Harada et al. 1996a)

△ 5°C; ● 20°C; □ 21~30°C; ○ 40°C

Fig. 1-8 Effect of pH and temperature on the stability of MC-LR(Cited from Harada et al. 1996a)

△ 5°C; ● 20°C; □ 21~30°C; ○ 40°C

MC-LR 分子的降解方式受到环境条件的影响。在温度为 40°C 及 pH 1(37 d) 或 pH 9(100 d) 的条件下, MC-LR 的降解产物主要是通过 Mdha 残基的水解而形成几种线形化的肽类(可能无毒), 最初的水解发生在 Mdha 残基处, 因其具有烯胺(enamine)结构; 而当甲醇存在时, 在酸性条件下, 酯化(esterification)作用远比水解作用重要(图 1-9), 所产生的甲酯无毒, 对 PP-1 和 PP-2A 无抑制作用。

此外, Wannemacher(1989)在实验条件下证实, MC-LR 在 300°C 下仍然稳定。

## 2. 光照对 MC 稳定性和异构化的影响

Harada 等(1990a, b)首次从两个日本湖泊(Tsukui 湖和 Sagami 湖)的水华蓝藻(主要是 *Microcystis viridis*)中分离得到 MC-LR 和 MC-RR 的两种几何异构体(geometrical isomer): Adda 残基中的 C6 双键从扩展的反式构型(E 构型)改变为顺式构型(Z 构型)(图 1-10)。Z 构型的毒性远低于其母体(E 构型)(Harada et al. 1990a)。在日本, 有毒蓝藻水华中 MC 的异构体(Z 构型)比例一般为 5%~15%(Tsuji et al. 1994)。在我国云南程海湖的蓝藻水华样品(*Microcystis aeruginosa* 约占 90%)中, 也发现 MC-RR 及其同分异构体的存在(吴冬辉等 1994)。

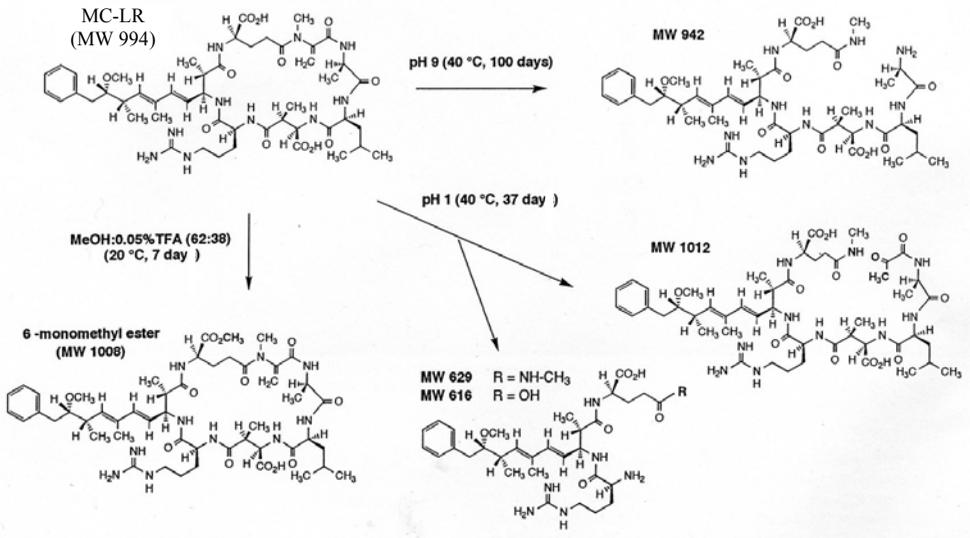


图 1-9 MC-LR 在不同温度和 pH 条件下的降解图解(引自 Harada et al. 1996a)

Fig. 1-9 Degradation scheme of MC-LR at different regimes of temperature and pH (Cited from Harada et al. 1996a)

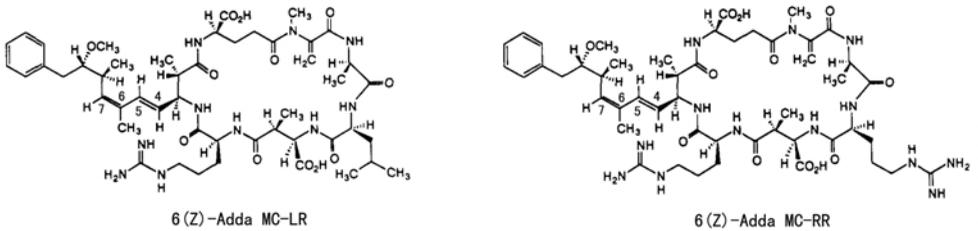


图 1-10 MC-LR 和 MC-RR 的几何异构体的结构: 6(Z)-Adda MC-LR 和 6(Z)-Adda MC-RR(引自 Harada et al. 1990b)

Fig. 1-10 Structures of the geometrical isomers of MC-LR and MC-RR: 6(Z)-Adda MC-LR and 6(Z)-Adda MC-RR (Cited from Harada et al. 1990b)

Tsuji 等(1994)研究了在各种色素溶液中光照对 MC-LR 稳定性和异构化的影响。将溶于蒸馏水中的 MC-LR 和其几何异构体 6(Z)-Adda MC-LR(以 85 : 15 的比例混合, 浓度 0.007~14 mg/L), 置于太阳光或日光灯下照射, 经过 26 天, 仍然有 86%以上 MC-LR 存在, 虽然在太阳光照射和 MC-LR 浓度为 14 mg/L 的情况下, 异构率(isomerization ratio)有轻微变化, 但在其他条件下无显著变化。因此, MC-LR 和其几何异构体对光照是稳定的。

将色素分为溶剂(丙酮)可提取色素(主要为 $\beta$ -胡萝卜素、叶绿素和一种红色类胡萝卜素 mixoxanthophyll)和水可提取色素(藻蓝素)。在太阳光照射的条件下, 色素的存在加速了 MC 的降解, 而与纯叶绿素 a 和 $\beta$ -胡萝卜素相比, 水可提取色素更能使 MC 有效地降解[图 1-11(A)]; 但是在日光灯照射的条件下, 在色素溶液中

的 MC-LR 并未显著降解。MC-LR 及 6(Z)-Adda MC-LR 都渐渐向其对应的异构体转化，在水可提取色素存在的条件下，经过 18 天达到平衡，此时的异构率约为 0.55[图 1-11(B)]。

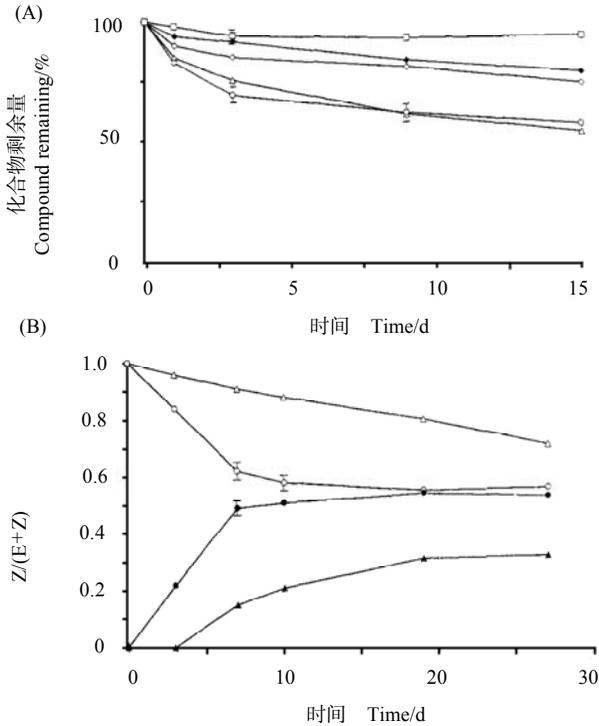


图 1-11 在各种色素溶液中以及在日光照射条件下，(A)MC 的下降(1990 年 11 月 10~24 日)和 (B)MC-LR 和 6(Z)-Adda MC-LR 的异构化(1991 年 4 月 12 日至 5 月 9 日) (引自 Tsuji et al. 1994)

(A) ◆叶绿素 a(20 mg/L); ◇β-胡萝卜素(20 mg/L); ○水可提取色素(5 mg/L); △溶剂(丙酮)可提取色素(5 mg/L); □无色素的蒸馏水。(B) ●水可提取色素溶液中的 MC-LR; ○水可提取色素溶液中的 6(Z)-Adda MC-LR; ▲溶剂可提取色素溶液中的 MC-LR; △溶剂可提取色素溶液中的 6(Z)-Adda MC-LR。色素浓度为 5 mg/mL，纵线为标准误差。Z/(E+Z)= 6(Z)-Adda MC/[MC+6(Z)-Adda MC]

Fig. 1-11 (A) Decrease of total MC (November 10~24, 1990) and (B) isomerization of MC-LR and 6(Z)-Adda MC-LR (April 12-May 9, 1991) by irradiation with sunlight in various pigment solutions (Cited from Tsuji et al. 1994)

(A) ◆ chlorophyll a (20 mg/L); ◇ β-carotene (20 mg/L); ○ water-extractable pigment (5 mg/L); △ solvent (acetone)-extractable pigment (5 mg/L). □ Distilled water without pigment. (B) ● MC-LR in water-extractable pigment solution; ○ 6 (Z)-Adda MC-LR in water-extractable pigment solution; ▲ MC-LR in solvent-extractable pigment solution; △ 6(Z)-Adda MC-LR in solvent-extractable pigment solution. Pigment concentration, 5 mg/mL; bar, standard error. Z/(E+Z): 6(Z)-Adda MC/[MC+6(Z)-Adda MC]

在太阳光照射的条件下，不同浓度的水可提取色素对 MC-LR 稳定性和异构化有显著影响：色素浓度越高，MC-LR 的分解速度越快[图 1-12(A)]，在 6 天和 8 天内，异构率与色素浓度之间存在线性关系[图 1-12(B)]，但是超过 8 天后，不存

在这种关系，由于 MC-LR 和其异构体均逐步被完全分解。MC-LR 的分解和异构化同时发生，但在色素浓度较高的情况下，分解过程占主导。色素和光对 MC-RR 和 MC-YR 的降解及其几何异构率的影响与对 MC-LR 的作用类似，3 种毒素 (MC-LR、MC-RR 和 MC-YR) 的异构率之间无显著差异。

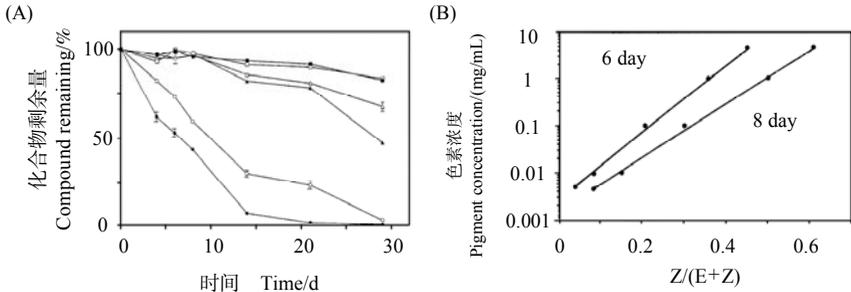


图 1-12 在太阳光照射的情况下，各种不同浓度的水可提取色素对 MC-LR 分解 (A) 和 MC-LR (10mg/L) 异构化 (B) 的影响 (1991 年 8 月 8 日~9 月 6 日)

(引自 Tsuji et al. 1994)

色素浓度: ● 5 mg/mL; ○ 1 mg/mL; ▲ 0.1 mg/mL; △ 0.01 mg/mL;  
□ 0.005 mg/mL; ■ 0 mg/mL。纵线为标准误差

Fig. 1-12 (A) Decomposition and (B) isomerization of MC-LR (10 mg/L) by irradiation with sunlight at various concentrations of water extractable pigment (August 8~September 6, 1991)

(Cited from Tsuji et al. 1994)

Concentrations of pigment: ● 5 mg/mL; ○ 1 mg/mL; ▲ 0.1 mg/mL; △ 0.01 mg/mL; □ 0.005 mg/mL;  
■ 0 mg/mL. Bar, standard error

### 3. UV 对 MC 稳定性和异构化的影响

Tsuji 等(1995)研究了紫外光(UV)对 MC 稳定性及异构化的影响。在 MC 的最大吸收波长附近(238 nm、242 nm 和 254 nm), MC 很容易被 UV 降解(图 1-13), 例如, 当用 238 nm 的 UV 照射时, MC-LR 的半衰期为 1 h, 但在 1 h 以后的 5 h 的照射期间则保持不变; 而用 365 nm 的 UV 照射 6 h 后, 仍然有 95% 以上的毒素未被降解。MC 的 UV 降解与光密度密切相关: 当用 254 nm (占 85%~95%) 的 UV 照射时, MC-LR 在 147  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  和 1360  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  光强时的半衰期分别为 10 min 和 1 min, 而在 2550  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  光强时被彻底降解(图 1-14); MC-RR 与 MC-LR 的结果类似。这表明, 在 MC 的最大吸收波长附近的 UV 对 MC 的降解作用远强于在色素存在条件下的太阳光(Tsuji et al. 1994)。

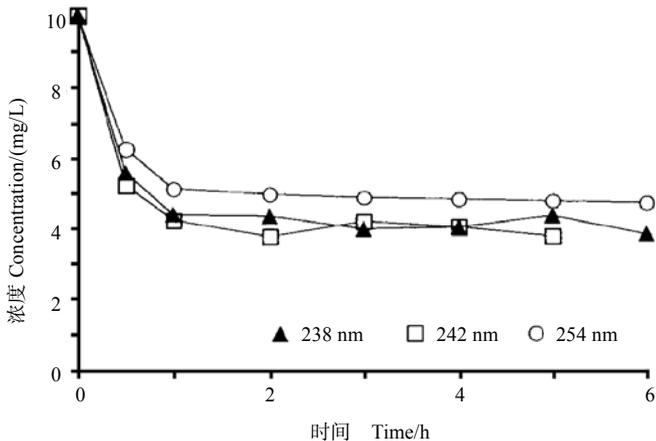


图 1-13 238 nm、242nm 和 254 nm UV 照射对 MC-LR 的分解(引自 Tsuji et al. 1995)

Fig. 1-13 Decomposition of MC-LR by UV irradiation at 238 nm, 242 nm and 254 nm (Cited from Tsuji et al. 1995)

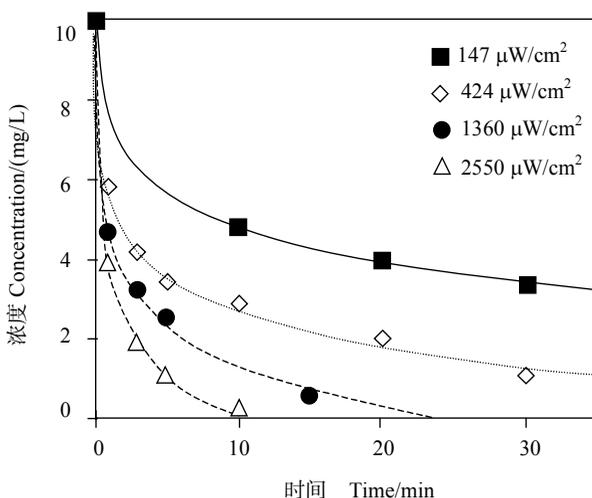


图 1-14 用不同光密度的 254 nm UV(通过灭菌灯)照射对 MC-LR 的分解(引自 Tsuji et al. 1995)

Fig. 1-14 Decomposition of MC-LR by UV light at 254 nm with different intensities using a germicidal lamp (Cited from Tsuji et al. 1995)

用较低光密度( $400 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ )的 UV(254 nm 占 85%~95%)照射 30 min, MC-LR 出现几种异构体: 6(Z)-Adda MC-LR 和 4(Z)-Adda MC-LR(图 1-15), 这与在色素存在条件下的太阳光降解有所不同; 此外, MC-LR 和 6(Z)-Adda MC-LR 向各自的异构体转化(异构率)的平衡点为 0.2~0.26(图 1-16)。

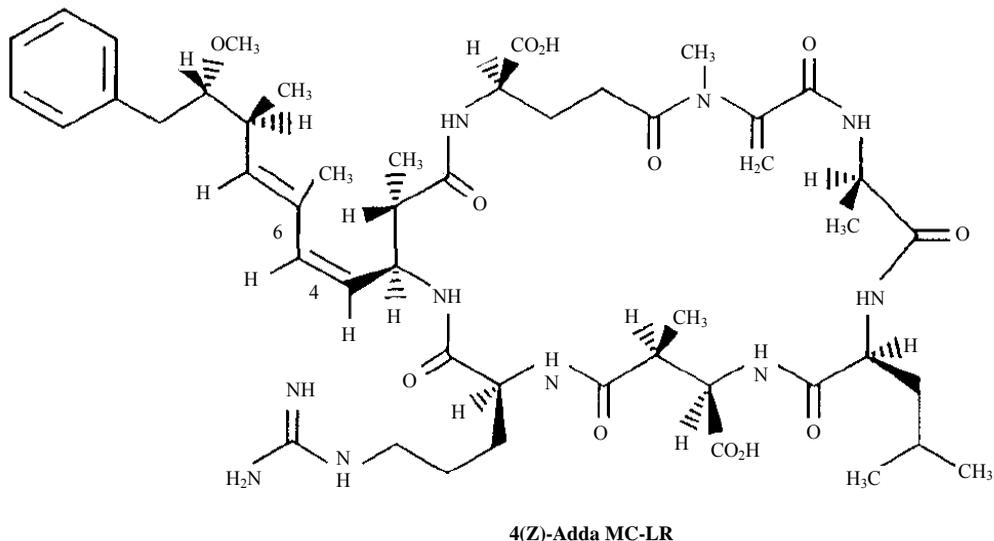


图 1-15 4(Z)-Adda MC-LR 的结构(引自 Tsuji et al. 1995)

Fig. 1-15 Structure of 4(Z)-Adda MC-LR (Cited from Tsuji et al. 1995)

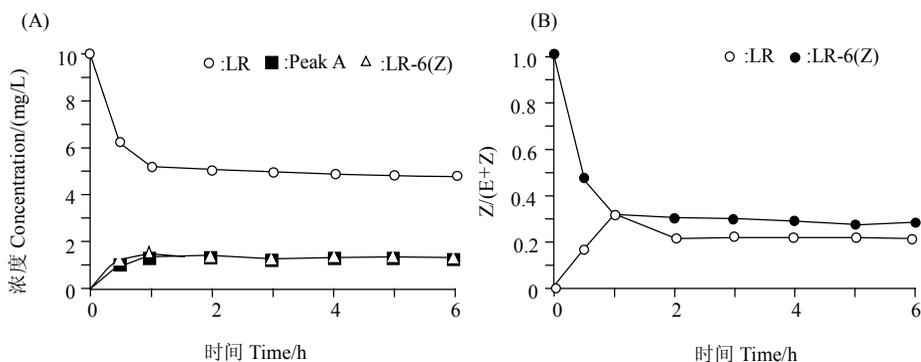


图 1-16 紫外线(氙灯)照射下 MC-LR 和 6(Z)-Adda MC-LR 异构化(A)和异构率(B)的时间变化 (引自 Tsuji et al. 1995)

MC-LR 和 6(Z)-Adda MC-LR 分别简称为 LR 和 LR-6(Z)

Fig. 1-16 Time-course of (A) isomerization and (B) isomerization ratios of MC-LR and 6(Z)-Adda MC-LR by UV irradiation with Xenon lamp (Cited from Tsuji et al. 1995)

MC-LR and 6(Z)-Adda MC-LR are abbreviated as LR and LR-6(Z), respectively

#### 4. 盐度对 MC 稳定性的影响

Mazur 和 Pliński (2001)在(17±1) °C 的水温及连续光照[40 μmol/(m<sup>2</sup> · s)]条件下, 研究了不同盐度(0、4、8、16 和 24 PSU)对 MC-LR 和 MC-RR 稳定性的影响。①当 MC(0.2 mg/L)置于灭菌的 BG-11 培养液时, 经过 1 周的时间, 在所有盐度条件下的 MC 含量均未发生显著变化, 3 个星期后, MC 浓度逐渐下降到初始浓度

的 60%左右(图 1-17 和图 1-18); ②当 MC 置于未灭菌的海水中(仅用 GF/C 滤膜过滤)时, MC 的降解速度比在 BG-11 培养液中快: 3 周后, MC-RR 和 MC-LR 分别降至初始浓度的 18.7%和 9.5%, 这可能与未灭菌海水中存在的细菌的分解作用有关; ③当用 *Microcystis aeruginosa* PCC 7820 抽提物(内含 MC-LR)代替纯 MC-LR 时, 3 周后抽提物中的 MC-LR 在 BG-11 培养液中的浓度降到了检测限以下, 这可能是由于蓝藻细胞抽提物中存在某些化合物加速了 MC-LR 的降解。

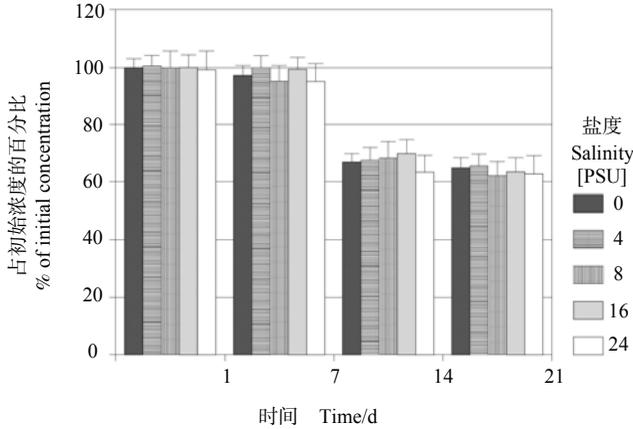


图 1-17 在不同盐度(0、4、8、16 和 24 PSU)条件下, BG-11 培养液中 MC-LR 浓度的变化(引自 Hazur and Pliński 2001)

Fig. 1-17 Changes in MC-LR concentration in BG-11 medium of different salinity (0, 4, 8, 16, 24 PSU)(Cited from Hazur and Pliński 2001)

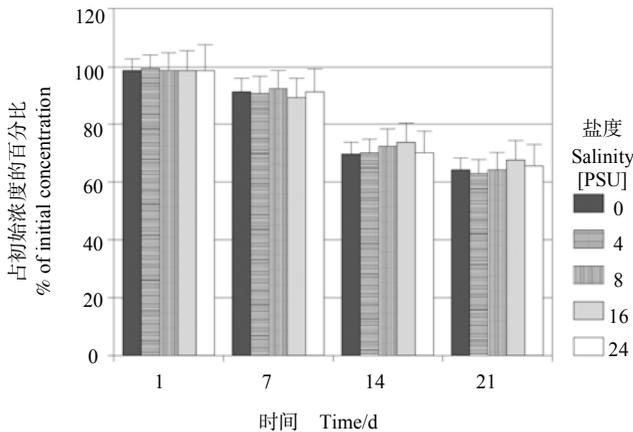


图 1-18 在不同盐度(0、4、8、16 和 24 PSU)条件下, BG-11 培养液中 MC-RR 浓度的变化(引自 Hazur and Pliński 2001)

Fig. 1-18 Changes in MC-RR concentration in BG-11 medium of different salinity (0, 4, 8, 16, 24 PSU)(Cited from Hazur and Pliński 2001)

## 五、MC 致毒的分子机制

蛋白质的丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸残基的磷酸化和去磷酸化，在调节许多细胞的生化过程中具有重要功能，如信号转导和蛋白质释放过程中酶的激活和抑制。蛋白激酶(protein kinase, PK)和蛋白磷酸酶(protein phosphatase, PP)作用于蛋白质中的丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸残基，分别影响它们的磷酸化和去磷酸化，所有有机体均借此调节各种细胞内生命过程(Sewald and Jakubke 2002)。20 世纪 90 年代初，一些科学家几乎同时发现 MC-LR 能强烈地抑制蛋白磷酸酶的活性(Honkanen et al. 1990, MacKintosh et al. 1990, Yoshizawa et al. 1990)。

### 1. 蛋白磷酸酶及其抑制剂

蛋白磷酸酶分为 3 个家族：磷酸化酪氨酸残基蛋白磷酸酶(phosphotyrosine residues phosphatase, PTP)、磷酸化丝/苏氨酸残基蛋白磷酸酶(phosphoserine and phosphothreonine residues phosphatase, PPP)和  $Mg^{2+}$  依赖的磷酸化丝/苏氨酸残基蛋白磷酸酶( $Mg^{2+}$ -dependent phosphoserine and phosphothreonine residues phosphatase, PPM)。真核生物的 PPP 家族可进一步分为 PP-1、PP-2A、PP-2B 和 PP-2C 4 类。其中，PP-1 主要作用于磷酸化酶激酶的  $\beta$  亚基，PP-2A 作用于磷酸化酶激酶的  $\alpha$  亚基，PP-2B 需要  $Ca^{2+}$  激活，PP-2C 需要  $Mg^{2+}$  作为辅助因子，后来又发现 PP-3、PP-4、PP-5、PP-6、PP-7 等新成员(刘卫军等 2003)。PPP 存在于所有真核细胞中，参与许多细胞过程(包括细胞周期进程、细胞增殖、蛋白质合成、转录调节、神经传递)的控制(Cohen 1989, Shenolikar 1994)。

MC-LR 能强烈地抑制 PP1 和 PP2A 的活性：对 PP1、PP-2A 和 PP-2B 的  $IC_{50}$  分别为 0.2 mol/L、0.2 mol/L 和 200 mol/L(Dawson and Holmes 1999)。MC 与 PP-1 和 PP-2A 的结合最初是非共价的，但也抑制酶活性；经过数小时后 MC 与 PP-1 和 PP-2A 形成共价结合(covalent linkage)，导致 PP-1 和 PP-2A 的不可逆的改变(MacKintosh et al. 1994, 1995, Craig et al. 1996)。MC 与 PP1 和 PP2A 的结合对凝胶过滤(gel filtration)、三氯乙酸(trichloroacetic acid)以及在 1% 的十二烷基硫酸钠(SDS)溶液中加热至 100  $^{\circ}C$  都是稳定的(Robinson et al. 1991a, Moorhead et al. 1994, MacKintosh et al. 1995)。

对蛋白磷酸酶有抑制作用的天然毒素不仅仅限于 MC。节球藻毒素(nodularin)、由海洋双鞭毛类产生的大田软海绵酸(okadaic acid)、斑蝥(一种甲虫)产生的斑蝥素(cantharidin)、花萼盘皮海绵产生的花萼海绵诱癌素(calyculin A)和由一种真菌产生的互变霉素(tautomycin)等都能抑制蛋白磷酸酶的活性(Honkanen et al. 1994)。由于真核生物体内的蛋白磷酸酶结构保守且具有重要功能，可能导致在进化的过程中这些酶容易成为这些毒素的攻击目标(MacKintosh et al. 1995)。

## 2. MC-LR 和 PP-1 复合物的晶体结构

根据  $^1\text{H}$  NMR 谱分析, MC-LR 有一个马鞍形骨架, Adda 残基侧链突出在其后(Bagu et al. 1995)。MC-LR 的自由溶液 NMR 结构(free solution NMR structure)与其同 PP-1 共价结合后的 X 射线晶体结构(X-ray crystal structure)在构象(conformation)上没有显著差异(图 1-19), 两个叠加骨架的方均根偏差(RMSD)为  $0.65 \text{ \AA}$ , 表明 MC-LR 与 PP-1 共价结合后仍然保持了其自由构象, 这可能是 MC-LR 对 PP-1 具有高亲和力(high affinity)的重要原因(Bagu et al. 1997)。

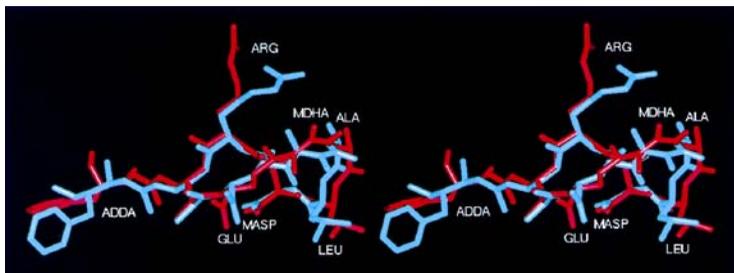


图 1-19 自由溶液 MC-LR 和结合的晶体 MC-LR 的立体图示比较 (引自 Bagu et al. 1997)  
MC-LR 的最小平均自由 NMR 结构用红色表示, 结合的晶体结构用蓝色表示。为清楚起见, 氢原子均未标出  
Fig. 1-19 Stereo view of comparison between the free solution microcystin-LR and bound crystal microcystin-LR (Cited from Bagu et al. 1997)

The free average minimized NMR structure of microcystin-LR is red, and the bound crystal structure is in blue. For clarity, neither structure has hydrogen atoms

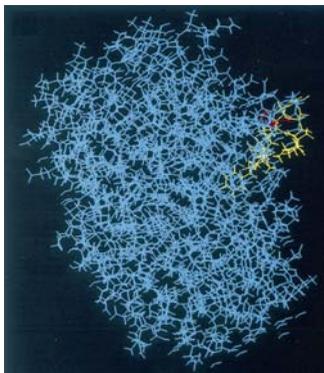


图 1-20 MC-LR 和 PP-1c 晶体结构复合物的整体图像(引自 Bagu et al. 1997)  
PP-1c 的原子用蓝色表示, 所结合的 MC 原子用黄色表示(Mdha 残基用红色表示)

Fig. 1-20 Overall view of the microcystin-LR and PP-1c crystal structure complex (Cited from Bagu et al. 1997)

PP-1c atoms are in blue, and bound microcystins atoms are in yellow with the exception of the Mdha residue, which is in red

MC-LR 和 PP-1 结合的晶体结构如图 1-20 所示。MC-LR 的 Mdma 与 PP-1 的 Cys-273 共价结合，MC-LR 分子相对包埋在 PP-1 之中，而这与从海绵 *Theonella swinhoei* 体内分离出的一种称为 motuporin(或 nodularin-V)明显不同,后者的 Mdma 残基在 motuporin 和 PP-1 复合物的表面突出(Bagu et al. 1997)。

### 3. MC 与 PP-1 的结合位点

MC-LR 的 7 个氨基酸残基为： $\beta$ 连接的赤- $\beta$ 甲基天冬氨酸(Masp)、L-精氨酸、Adda、 $\gamma$ 连接的 D-谷氨酸、Mdha、D-丙氨酸和 L-亮氨酸。MC-LR 具有坚固的马鞍形(rigid saddle-shaped)骨架，因而为其与 PP-1 之间的疏水、离子及共价连接提供了合适的框架：这些连接包括了 Adda、Masp 和 Glu 残基，而 Mdha 为二次共价结合(secondary covalent linkage)所必需；因为疏水性(hydrophobicity)可能是 MC-LR 和 PP-1 结合的最初的动力，Adda 残基可能首先负责将其环状骨架锚定(anchoring)在 PP-1 的结合位点上；其他参与抑制作用的残基 Masp 和 Glu 在马鞍下方的 D 型带负电的羧基正好与 PP-1 上带正电的 Arg<sup>96</sup> 结合；最后，在抑制作用之后的二次共价结合依赖于位于毒性马鞍前端和顶端的被修饰的氨基酸 Mdha 与 Cys<sup>273</sup> 之间的共价键(Bagu et al. 1997)。

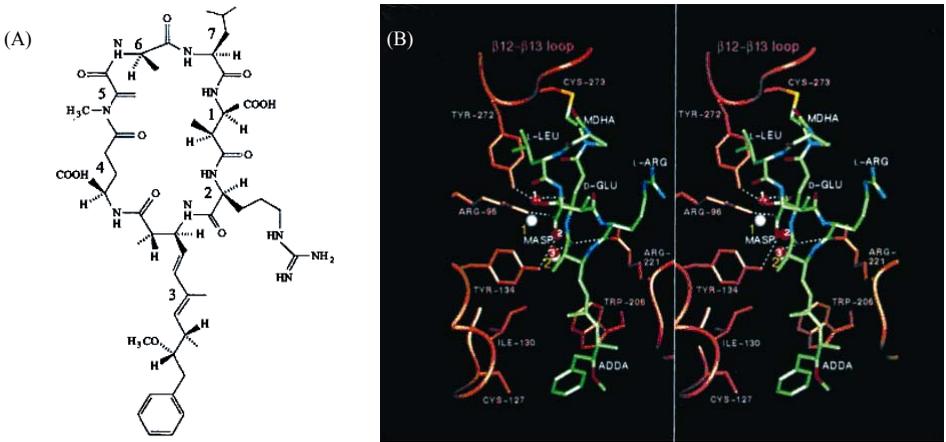


图 1-21 (A) 环状 7 肽 MC-LR 的分子结构式和(B) MC-LR 在 PP-1 活性部位的立体图(引自 Goldberg et al. 1995)

MC-LR 分子根据不同的原子类型进行编码：碳原子为绿色，氮原子为蓝色，氧原子为红色；主链和所选择的蛋白质原子为褐色，金属离子 M1 和 M2(白色)和水分子 W1、W2 和 W3(红色)用球形表示，Cys<sup>273</sup> 的  $\gamma$ -硫原子用黄色表示。MC-LR 的整体构型与通过核磁共振光谱仪(NMR)观察到的结果非常相似

Fig. 1-21 (A) Structural formula of the cyclic heptapeptide molecule, and (B) Stereo view of microcystin-LR at the active site of PP-1 (Cited from Goldberg et al. 1995)

The microcystin molecule is colour-coded according to atom type: carbon, green; nitrogen, blue; oxygen, red. Main-chain and selected side-chain protein atoms are in brown; metal ions M1 and M2 (white) and waters W1, W2 and W3 (red) are drawn as spheres; the gamma-sulphur atom of Cys<sup>273</sup> is yellow. The overall conformation of the microcystin is very similar to that observed in solution by NMR

从图 1-21 可见, MC 与 PP-1 表面的 3 个位点进行结合: 金属结合位点、疏水凹槽及邻近活性位点的 C 端凹槽的边缘。Mdha 侧链的  $\beta$  碳原子与 PP-1 的 Cys<sup>273</sup> 形成共价键,  $\gamma$  连接的 D-谷氨酸侧链羧基和邻近羧基的氧原子与两个水分子(W1 和 W3)形成氢键, Masp 侧链的羧基与 Arg<sup>96</sup> 和 Tyr<sup>134</sup> 形成氢键, 疏水的 Adda 残基包埋在由一些疏水残基形成的凹槽中, L-亮氨酸残基位于 Tyr<sup>272</sup> 侧链附近(Bagu et al. 1997)。

MC 和 PP 之间的共价结合可能与致癌性的存在与否有关。Bagu 等(1997)推测, MC-LR 为何缺乏致癌性(carcinogenic), 是因其亲电子的 Mdha 残基与 PP-1 和 PP-2A 形成了共价结合, 从而不能再与其他大分子形成加合物(adduct); 而不能形成共价结合的 motuporin 和节球藻毒素(nodularin)可能具有致癌性, 因其亲电子的 Mdha 残基即便与 PP 结合也可能还会与其他信息大分子的亲核基团形成直接的加合物。

#### 4. MC 结构的改变对其毒性的影响

一般来说, 由于环肽活性部分的柔性和构象限制, 肽-受体相互作用的构象受到广泛关注(Sewald and Jakubke 2002)。Adda 的整体形状对 MC 的毒性至关重要。例如, 当 Adda 残基中的 C6 双键从扩展的 E 构型改变为 Z 构型时, 毒性大大降低: 对蛋白磷酸酶的 IC<sub>50</sub> 增加 100 倍(Nishiwaki-Matsushima et al. 1992), 对小白鼠腹腔注射 MC-LR 和 MC-RR 的 LD<sub>50</sub> 值分别大约为 50  $\mu$ g/kg BW 和 600  $\mu$ g/kg BW (Krishnamurthy et al. 1986, Watanabe et al. 1988), 而注射其几何异构体(Z 构型)时, 高达 1.2 mg/kg BW 的剂量都未出现毒性(Harada et al. 1990a)。

Tsuji 等(1995)的研究也表明, MC-LR 与其异构体 6(Z)-Adda MC-LR 和 4(Z)-Adda MC-LR 的毒性差异巨大: 两种异构体即使腹腔注射剂量达 1.5 mg/kg, 也未产生肝毒性, 而对 PP-2A 的抑制作用要低 10<sup>5</sup> 倍(表 1-5)。

表 1-5 MC-LR 的几何异构体的 LD<sub>50</sub>(腹腔注射小白鼠)以及对蛋白磷酸酶 2A 的抑制效应  
Table 1-5 LD<sub>50</sub> (i.p., mouse), inhibition effect on protein phosphatase 2A of geometrical isomers of MC-LR

毒素 Toxin	LD <sub>50</sub> /(μg/kg)	IC <sub>50</sub> /(ng/L)
MC-LR	50	50
6(Z)-Adda MC-LR	—*	5×10 <sup>6</sup>
4(Z)-Adda MC-LR	—*	5×10 <sup>6</sup>

\*剂量达 1.5 mg/kg 也未产生毒性(引自 Tsuji et al. 1995)

\*No toxicity at concentration up to 1.5 mg/kg (Cited from Tsuji et al. 1995)

从抑制大白鼠体内的 PP-1 和 PP-2A 以及导致其肝脏 GPT(谷丙转氨酶, glutamic pyruvic transaminase)向血液的释放量来看, 6(Z)-Adda MC-LR 和 MC-RR

仅为 6(E)-Adda MC-LR 和 MC-RR 的 1/10~1/100(Nishiwaki-Matsushima et al.1992)。

此外, Glu 残基上的自由羧酸(carboxylic acid)对 MC 的毒性至关重要, 该基团的任何改变都会导致活性完全丧失(Dawson and Holmes 1999)。用乙硫醇(ethanethiol)还原 MC-YR 的 MdhA 残基, 阻止了 MdhA 残基与 PP-1 的共价结合, 使 MC-YR 对野生型 PP-1 的 IC<sub>50</sub> 值增加了 5 倍(表 1-6)。

线形化使 MC 失去毒性。Choi 等(1993)从 *Microcystis* sp. 中分离出 MC 的线形多肽前体(precursor), 发现即便使用超过 1 mg/kg BW 的剂量, 也未对小白鼠产生急性毒性。

MC 的有些结构改变对毒性无明显影响, 如 Adda 侧链上的 C9 处的脱甲基化对 MC 的毒性几乎没有影响; MC-LR 的几个异构体[MC-LR 中的可变氨基酸-精氨酸(arginine)被丙氨酸(alanine)、甲硫氨酸(methionine)、苯丙氨酸(phenylalanine)、亮氨酸(leucine)和高丝氨酸(homoserine)所取代]之间的毒性也无明显差异, 这从 Arg 被取代的几种 MC 对 PP-1 的 IC<sub>50</sub> 值(0.06~0.4 nmol/L)与 MC-LR 的 IC<sub>50</sub> 值十分接近得到证实(Crag et al. 1993, Dawson and Holmes 1999)。

蛋白磷酸酶结构的改变也能对 MC 的毒性产生影响。用 Ala、Ser 和 Leu 置换 PP-1 中的 Cys<sup>273</sup> 可破坏 MC-LR 与 PP-1 的共价连接, 使 MC-LR 对 PP-1 的 IC<sub>50</sub> 值增加 10~20 倍; 而用 Phe 置换 Tyr<sup>272</sup> 或用 Ala 置换 Ser<sup>268</sup> 则对 IC<sub>50</sub> 值无影响或影响不大(表 1-6)。

表 1-6 MC 对野生型和突变型 PP-1 催化亚单位的抑制。每个试验中 PP-1 的浓度为 0.05 nmol/L, IC<sub>50</sub> 为达到 50%抑制时的浓度

Table 1-6 Inhibition of wild-type and mutant forms of the protein phosphatase-1 catalytic subunit by MC. The concentration of PP1 in each assay was 0.05 nmol/L, and IC<sub>50</sub> is the concentration required for 50% inhibition

PP-1 的形态 Form of PP-1	IC <sub>50</sub> /(nmol/L)		
	MC-LR	MC-YR	ETMC-YR
野生型 Wild type	0.2	0.2	0.9
Ser <sup>268</sup> → Ala	0.1		
Tyr <sup>272</sup> → Phe	0.2		
Cys <sup>273</sup> → Ala	4.0		
Cys <sup>273</sup> → Leu	4.0	3.0	4.0
Cys <sup>273</sup> → Ser	2.2		

(引自 MacKintosh et al. 1995)(Cited from MacKintosh et al. 1995)

## 第二章 动物体内 MC 的萃取与检测技术

由于 MC 分布于动物体内的各种组织和器官(如肝脏或肝胰腺、肌肉、肾脏、脾脏、胆囊、血液、肠道等)中,且含量低,需对样品进行预处理(分离、纯化)后才能进行分析测定。分离包括固液萃(浸)取和固液分离。纯化主要是在不导致 MC 损失的前提条件下,去除杂质,并使 MC 得到浓缩。

如果不去杂质,在色谱图上的小毒素峰可能被同时洗脱下来的其他基质(matrix substance)所掩盖而无法辨别出来,如果毒素峰不能与基质很好地分离,可能使毒素浓度被高估;对基本仅含蓝藻的水华样品的筛选(screening)和监测(monitring)来说,不需经过去杂质的分析或生物评价(bioassay)也能获得满意的结果;但是对动物样品(如鱼类、甲壳动物等)中的毒素分析,去杂质方法的建立将十分必要(Harada et al. 1999)。

### 一、动物体内 MC 的萃取技术

动物体内 MC 的预处理技术大致可分为固液萃(浸)取、固液分离和固相萃取等步骤。

#### 1. 固液萃(浸)取

首先,必须用溶剂将各种动物组织中的 MC(溶质)提取出来。为了使动物组织中的 MC 能够很快地接触溶剂,还需先将动物组织冻干后进行研磨或粉碎,或对鲜样进行匀浆、切片等处理。

最常用的动物组织中 MC 萃取溶剂主要有:① 70%~100%甲醇;② 正丁醇:甲醇:水(1:4:15, V/V/V);偶有用 5%或 20%醋酸水溶液、酸化甲醇(1%三氟乙酸)进行萃取的(表 2-1)。一般认为,极性强的溶剂(如 5%醋酸)能有效地萃取极性较强的 MC,但对疏水的 MC 的萃取效率较差;甲醇为最常用的溶剂,因为其萃取效率高,也具有通过蒸发能快速浓缩的优点,但纯甲醇可能对极性 MC 的萃取效率较差,因此往往用添加少量的水来克服这一弱点(Harada et al. 1999)。一般在萃取过程中还辅助使用一些物理方式(如超声波、振荡、匀浆)来提高萃取效率(表 2-1)。

#### 2. 固液分离

一般用离心或过滤除去不溶物,获得含 MC 的粗萃取液。由于不溶性固体与萃取溶剂往往不能一次性完全分离,通常还要反复进行萃取和离心(或过滤)分离(表 2-1)。

表 2-1 各种萃取过程的比较

Table 2-1 A comparison of various extraction procedures

样品类型 (样品量)	萃取方式	萃取溶剂	粗萃取液收集	总萃取时间	文献
Type of samples(wt of sample used)	Method of extraction	Solvent for extraction	Collection of crude extract	Time for extraction	Reference
蚌干样 Lyophilized mussel (1~4 g)	水浴超声 Bath sonification	正丁醇: 甲醇: 水 BuOH:MeOH:H <sub>2</sub> O (1:4:15)	离心, 固形物再萃取 1 次 Centrifugation (1h, 48 000 g), with pellets re-extracted	(30 min + 1 h) × 2	Eriksson et al. 1989
蚌干样 Lyophilized mussel (0.02 g/mL)	水浴超声 Bath sonification	正丁醇: 甲醇: 水 BuOH:MeOH:H <sub>2</sub> O (1:4:15)	离心, 固形物再萃取 1 次 Centrifugation (30 min, 6000 r/min), with pellets re-extracted	(30 min + 30 min) × 2	Vasconcelos 1995
螺等冻干样 Lyophilized snails etc. (0.1~0.5 g)	超声+静置 Sonification and settling	醋酸溶液 Acetic acid (5%)	过滤 Filtered	过夜 overnight	Kotak et al. 1996b
鱼肝脏干样 Lyophilized fish liver	静置 Settling	甲醇 MeOH	?	?	Kotak et al. 1996b
鱼胆囊干样 Lyophilized fish gallbladder (5~150 µL)	静置+水浴超声 Settling and bath sonification	甲醇 MeOH	静置 18 h、超声 5 min、再静置 1 h Extracted for 18h, sonicated for 5 min, and extracted again for 1 h	18 h+5 min + 1 h	Sahin et al. 1996
鱼肝脏干样 Lyophilized fish liver	振荡+超声 Shaking and sonification	甲醇 MeOH	离心, 固形物再超声萃取 1 次 Centrifugation (5min, 1000 g) with residue re-extracted	过夜 overnight + 5 min + 1 h	Tencalla and Dietrich 1997
蚌干样 Lyophilized mussel (0.3 g DW/mL)	?	80% 甲醇 80% MeOH	离心 Centrifugation (3 min, 15 000 g)	?	Prepas et al. 1997
螺器官干样 Lyophilized organs of snail (0.1 g)	超声+静置 Sonification + settling	甲醇 MeOH	静置 1 夜后过滤, 固形物再萃取 2 次 Settled overnight and then filtered, and the solids were re-extracted twice	20 s + 过夜 overnight × 3	Zurawell et al. 1999
蚌器官干样 Lyophilized organs of mussel (1 g)	超声粉碎 Ultrasonic disintegration	正丁醇: 甲醇: 水 BuOH:MeOH:H <sub>2</sub> O (1:4:15)	离心, 固形物再超声萃取 1 次 Centrifugation (10 min, 5400 r/min) with residue re-extracted	(30 s + 10 min) × 2	Amorim and Vasconcelos 1999

样品类型 (样品量)	萃取方式	萃取溶剂	粗萃取液收集	总萃取时间	文献
Type of samples (wt of sample used)	Method of extraction	Solvent for extraction	Collection of crude extract	Time for extraction	Reference
螺、蚌、虾和鱼各种器官的干样 Lyophilized organs of snail, mussel and shrimps (0.2-0.5 g)	振荡 Shaking	正丁醇: 甲醇: 水 BuOH:MeOH:H <sub>2</sub> O (1:4:15)	离心, 固形物再萃取 2 次 Centrifugation (1 h, 18 000 r/min) with solids were re-extracted twice	(1 d+1 h) × 3	Yokoyama and Park 2002, 2003, Ozawa et al. 2003, Chen and Xie 2005a, b, Chen et al. 2005, Xie et al. 2004, Xie et al. 2005, Li et al. 2005
鱼组织冻干样 Lyophilized fish tissue	振荡 Shaking	醋酸溶液 Acetic acid (5%)	离心 Centrifugation (12 000g)	1 h×2	Jang et al. 2004
鱼肝脏冻干样 Lyophilized fish liver	水浴超声 Bath sonification	70% 甲醇 70% MeOH	离心后, 已烷萃取数次 Centrifuged, and purified in a repeated washing step with hexane	12 h×2	Ibelings et al. 2005
鱼组织冻干样 Lyophilized fish tissue	用磁力搅拌器混合 Mixing with a magnetic stirrer	甲醇 MeOH	?	30 min×2	Zhou et al. 2006
鱼组织冻干样 Lyophilized fish tissue	超声萃取 Extracted by sonification	正丁醇: 甲醇: 水 BuOH:MeOH:H <sub>2</sub> O (1:4:15)	离心 20min, 重复 3 次 Centrifugation (3200 g) for 20 min, repeated three times	(3 min + 20 min) × 3	Xie and Park 2007
鱼肝鲜样 Fresh fish liver	匀浆后萃取 Homogenized and extracted	甲醇 MeOH	先倒出甲醇萃取液, 再萃取 12 h, 合并萃取液并悬浮于 MeOH/H <sub>2</sub> O(4:1) 溶液中, 离心, 再用已烷萃取 Decanted from the first extraction, and retracted for another 12 h, the two MeOH extracts were combined and resuspended in MeOH/H <sub>2</sub> O(4:1), centrifuged (15 min, 3000 r/min), and extracted with hexanes	12 h×2 + 15 min	Andersen et al. 1993
蚌鲜样 Fresh mussel (15 g)	匀浆 Homogenization	甲醇 MeOH	离心后, 己烷萃取数次 Centrifugation (15 min, 1600 g), followed by a washing step with hexane	15 min	Chen et al. 1993
蚌鲜样 Fresh mussel (1.5~2.6 g)	?	甲醇 MeOH	过滤后, 固形物再萃取 1 次 Filtration with residue re-extracted	16 h×2	Williams et al. 1997c

Type of samples (wt of sample used)	样品类型 (样品量)	萃取方式	萃取溶剂	粗萃取液收集	总萃取时间	文献
		Method of extraction	Solvent for extraction	Collection of crude extract	Time for extraction	Reference
鱼肝鲜样		?	甲醇 MeOH	萃取 4 次 Extracted four times	?	Williams et al. 1997a
Fresh fish liver (0.3 g)						
鱼肝鲜样		?	甲醇 MeOH	过滤, 固形物再萃取 1 天 Filtration with residue re-extracted for 1 d	2d+1d	Williams et al. 1997b
Fresh fish liver (0.12~0.68 g)						
蚌器官鲜样		匀浆和振荡	醋酸溶液	先离心, 固形物再萃取 2 次, 后将合并的上清液过滤	5 min + (10 min + 30 min)×3	Watanabe et al. 1997
Fresh organs of mussel (0.4~13.5 g)		Homogenization and shaking	Aqueous acetic acid (20%)	Centrifugation (30 min, 24 000 g) with precipitate re-extracted twice, and then with combined supernatant filtered		
鱼组织鲜样		?	甲醇 MeOH	<sup>#</sup> 己烷萃取 3 次 <sup>#</sup> Hexane extraction (3 times)	?	Magalhães et al. 2001, Soares et al. 2004
Fresh fish organs (5 g)						
鱼鲜样		匀浆	75% 甲醇	离心, 固形物再萃取 1 次	(3+10) min×2	Lawrence and Menard 2001
Fresh fish (3 g)		Homogenization	75% MeOH	Centrifugation (10 min, 4500 r/min) with pellets re-extracted		
鱼肝脏鲜样		振荡+振荡	甲醇 MeOH	离心, 固形物再萃取, 再离心	4 h + 1 h + 过夜 overnight + 3 min	Malbrouck et al. 2003, 2004a, b, Li et al. 2004
Fresh fish liver		Agitating + Shaking		Centrifugation (1h, 20 000g), with pellets re-extracted and centrifuged (3 min, 10 000 g)		
蚌鲜样		匀浆-水浴超声+探头超声	75% 甲醇	离心	30 min + 1 min + 10 min	Pires et al. 2004
Fresh mussel		Homogenization in an ultrasonic bath + probe sonification	75% MeOH	Centrifugation (10 min, 10 000 g)		
鱼组织鲜样		匀浆和振荡	90% 甲醇	离心	过夜	Mohamed et al. 2003, Mohamed and Hussein 2005
Fresh fish organ		Homogenization and stirring	90% MeOH	Centrifugation (5000 r/min or 10 000 r/min)	overnight×2	
鱼肝脏和肠道鲜样		匀浆	85% 甲醇	离心, 固形物再萃取 1 次	(1 min + 10 min) ×2	Moreno et al. 2005
Fresh fish liver and intestines (0.5 g)		Homogenization	85% MeOH	Centrifugation (10 min, 4500 r/min) with residue re-extracted		

样品类型 (样品量)	萃取方式	萃取溶剂	粗萃取液收集	总萃取时间	文献
Type of samples (wt of sample used)	Method of extraction	Solvent for extraction	Collection of crude extract	Time for extraction	Reference
鱼组织鲜样 Fresh fish tissues (5 g)	匀浆+水浴超声 Homogenization + bath sonification	75% 甲醇 (含 1% 三氟乙酸) 75% MeOH (containing 1% trifluoroacetic acid)	离心 Centrifugation (10 min, 12 096 g)	5 min + 10 min	Cazenave et al. 2005
人血清 Human serum	混合 Mixing	甲醇 MeOH	离心, 固形物再萃取 1 次, # 己烷萃取 4 次 Centrifugation (30 min, 9000 r/min) with residue re-extracted. # Hexane extraction (4 times)	30 min×2	Hilborn et al. 2005
鱼肝脏鲜样 Fresh fish liver	轮流搅拌和超声 (每隔 1h) Alternate shaking and ultrasonication (at hourly interval)	正丁醇 : 甲醇 : 水 BuOH : MeOH : H <sub>2</sub> O (1 : 4 : 15)	离心 Centrifugation (20 min, 15 000 g)	8 h + 20 min	Ernst et al. 2005
人肝脏 Human liver	匀浆 2 次 Homogenized twice	甲醇 MeOH	离心, # 己烷萃取 Centrifugation (7000 g), # hexane extraction	24 h×2	Carmichael et al. 2001, Azevedo et al. 2002

# 己烷萃取: 将甲醇萃取物与等量或 3 倍的己烷混合, 去除己烷层

# Hexane extraction: MeOH extract was mixed with equal or 3-time volume of hexane, and hexane layers were discarded

有些研究直接测定粗萃取液(crude extract)中的 MC 含量,多使用蛋白磷酸酶抑制法(PPIA)(Sahin et al. 1996, Williams et al. 1997a, b, c, Prepas et al. 1997, Malbrouck et al. 2003, 2004a, b, Li et al. 2004),偶有使用 LC-MS(Pires et al. 2004, Moreno et al. 2005)或 HPLC 法(Zurawell et al. 1999)。

固液萃取过程中,也往往因为粗萃取液中除溶质(MC)外,还富集大量物理化学性质类似的杂质,干扰 MC 的准确定量分析。因此,一般还要将这些粗萃取液进一步除去杂质(一般通过固相萃取)后进行测定。有少数研究在进行固相萃取之前,为了除去脂溶性杂质,还对上述 MC 的粗萃取液进行液液萃取:将甲醇萃取液与等量或 3 倍的己烷混合,去除己烷层,反复数次(Magalhães et al. 2001, Carmichael et al. 2001, Azevedo et al. 2002, Soares et al. 2004, Ibelings et al. 2005)。

## 二、动物体内 MC 的纯化技术——固相萃取

液相色谱依据相间的极性分为两类:当固定相极性大于流动相时,称为正相色谱(normal phase chromatography, NPC);而当固定相极性小于流动相时,称为反相色谱(reversed phase chromatography, RPC)。正相色谱依据溶质极性的不同而产生的在吸附剂上吸附强弱的差异而分离,而反相色谱依据因溶质疏水性的不同而产生的溶质在流动相与固定相之间分配系数的差异而分离(刘国诠和余兆楼 2001)。

固相萃取柱(solid phase extraction, SPE)的分离原理、相的选择性和方法的建立与 HPLC 类似(盛龙生等 2003)。SPE 常用反相技术(如 C<sub>18</sub> 填料)。SPE 最常用的形式是将一定量(如 0.5~5 g)的填料装在类似于塑料医用注射筒中,称为 SPE 小柱(SPE cartridge)。

纯化 MC 的固相萃取主要分为两种类型(表 2-2):单 SPE 柱方法(多使用反相的 C<sub>18</sub> 小柱 ODS cartridge)和组合 SPE 柱方法[一般首先使用 C<sub>18</sub> 小柱后,紧接着使用正相的硅胶小柱(silica gel cartridge)]。在加样之前,需使填料活化(conditioning),其目的是为了除去小柱储存过程中可能吸附的杂质,以及使填料溶剂化(盛龙生等 2003)。例如,在 ODS 小柱中加入数倍柱床体积的甲醇,使填料活化,再用水将甲醇置换(Xie et al. 2004)。

常用溶剂的极性对固相萃取中杂质的洗涤(rinse)和目标化合物的洗脱(elute)过程非常重要。化合物的介电常数越大,极性越强(欧阳平凯和胡永红 2003)。常用溶剂的介电常数大小的顺序为(20℃):正乙烷(1.88)<环乙烷(2.02)<四氯化碳(2.24)<苯(2.3)<甲苯(2.4)<乙醚(4.3)<氯仿(4.8)<乙酸乙酯(6.0)<乙酸(6.2)<正丁醇(17.5)<正丙醇(20.3)<丙酮(20.7)<乙醇(24.6)<甲醇(32.7)<乙腈(37.5)<水(78.5)(于世林 2000)。

采用不同的预处理方法,对动物组织加标 MC 所得的回收率变异很大,但大多数在 50%~80%(表 2-3)。

表 2-2 各种不同小柱的加标回收率

Table 2-2 The recoveries of the different kinds of cartridges

小柱 Cartridges	添加的 MC Added MC( $\mu\text{g}$ )	回收率 Recovery(100%)	
		MC-RR	MC-LR
酸性氧化铝小柱 Alumina A	MC-LR: 12.6	-	0.70
硅胶柱 Silica gel (2g)	MC-LR: 7.10	-	69.3
Plus 硅胶柱串接	MC-LR: 7.10	-	96.5
Plus silica gel (0.69g) tandem			
Plus 硅胶柱	MC-LR: 6.21	-	56.3 $\pm$ 4.9
Plus silica gel (0.69g)			
阳离子交换-反相吸附柱	MC-RR: 11.4	57.5 $\pm$ 2.5	66.0 $\pm$ 0.3
Oasis MCX (0.5g)	MC-LR: 3.10		
十八碳基键合硅胶小柱	MC-RR: 11.4	91.5 $\pm$ 4.9	75.0 $\pm$ 3.2
ODS (5g)	MC-LR: 3.10		
亲水-亲脂平衡反相吸附柱	MC-RR: 11.4	94.1 $\pm$ 3.0	97.2 $\pm$ 0.7
Oasis HLB (0.5g)	MC-LR: 3.10		
硅胶串接 plus 硅胶小柱	MC-RR: 11.4	100.2 $\pm$ 0.6	98.9 $\pm$ 0.2
Silica gel (2g)/plus silica gel (0.69g) tandem	MC-LR: 3.10		

- 指仅用了 MC-LR means only used MC-LR

(引自 Xie and Park 2007) (Cited from Xie and Park 2007)

## 1. 单 SPE 柱方法

### ODS 柱

在 MC 的固相萃取中，反相 SPE 柱 ODS 小柱的应用最为广泛(表 2-3)，萃取过程如下：将粗萃取液的水溶液加在活化过的  $\text{C}_{18}$  小柱上，由于 MC 可保留在固定相中，用强极性溶剂(10%~30%甲醇，或者先后用水和 20%甲醇)洗涤，则可除去一些水溶性干扰物，然后，用强溶剂(80%~100%甲醇)洗脱和收集 MC。在多数研究中将这种通过反相 SPE 柱萃取得到的含 MC 溶液直接上 HPLC 进行测定。

### HLB 柱

还有一种 SPE 柱采用聚合物填料，如二乙烯苯-*N*-乙烯吡咯烷酮共聚物，这种填料既有亲水性，又有亲脂性，商品有 Oasis HLB，HLB 意为亲水-亲脂平衡(hydrophilic-lipophilic balance)(盛龙生等 2003)。Hilborn 等(2005)用 HLB 小柱来纯化人血清中的 MC。

### 免疫亲和色谱柱

Kondo 等(1996)发展了用 MC-LR 的单克隆抗体(anti-MC-LR monoclonal antibody)进行免疫亲和纯化的方法，并非常有效地清除了小白鼠和大白鼠肝细胞中的杂质，从而使 MC 的色谱峰能清楚地被检测出(图 2-1)。

表 2-3 各种净化过程的比较

Table 2-3 A comparison of various clean-up procedures

样品 Samples	第 1 次净化(除亲水性杂质) The first clean-up (eliminate hydrophilic impurities)			第 2 次净化(除疏水性杂质) The second clean-up (eliminate hydrophobic impurities)			文献 Reference
	萃取柱 Extraction column	除杂质冲洗 Rinse of impurities	洗脱 MC Elution of MC	萃取柱 Extraction column	除杂质冲洗 Rinse of impurities	洗脱 MC Elution of MC	
蚌干样	C <sub>18</sub> 柱	?	?				Eriksson et al. 1989,
Lyophilized mussel	C <sub>18</sub> Column						Vasconcelos 1995
螺、鱼肝脏等冻干样	C <sub>18</sub> 小柱	25% 甲醇	甲醇				Kotak et al. 1996b
Lyophilized snails	C <sub>18</sub> Cartridge	25% MeOH	MeOH				
and fish liver etc.							
蚌器官干样	C <sub>18</sub> 小柱	用水和 20% 甲醇先后洗柱	80% 甲醇				Amorim and
Lyophilized organs of mussel	C <sub>18</sub> Cartridge	Water, followed by 20% MeOH	80% MeOH				Vasconcelos 1999
鱼组织冻干样	C <sub>18</sub> 小柱		甲醇				Jang et al. 2004
Lyophilized fish tissue	C <sub>18</sub> Cartridge		MeOH				
蚌鲜样、螺、蚌、虾和	C <sub>18</sub> 小柱	用水和 20% 甲醇	90% 甲醇	硅胶柱	甲醇	70% 甲醇	Watanabe et al.
鱼各种器官的冻干样	ODS Cartridge	先后洗柱	90% MeOH	Silica gel	MeOH	70% MeOH	1997, Yokoyama
Fresh mussels,	(5g)	Water, followed		cartridge (2g)			and Park 2002,
lyophilized organs		by 20% MeOH					2003, Ozawa et al.
of snails, mussels							2003, Chen and Xie
and shrimps							2005a,b, Chen et al.
鱼肝脏冻干样	C <sub>18</sub> 柱		70% 甲醇(用				2005, Xie et al.
Lyophilized fish liver	C <sub>18</sub> Column		三氟乙酸酸化)				2004, Xie et al.
							2005, Li et al. 2005
							Ibelings et al. 2005

样品 Samples	第1次净化(除去亲水性杂质) The first clean-up (eliminate hydrophilic impurities)			第2次净化(除去疏水性杂质) The second clean-up (eliminate hydrophobic impurities)			文献 Reference
	萃取柱 Extraction column	除杂质冲洗 Rinse of impurities	洗脱 MC Elution of MC	萃取柱 Extraction column	除杂质冲洗 Rinse of impurities	洗脱 MC Elution of MC	
鱼组织冻干样 Lyophilized fish tissue	C <sub>18</sub> 小柱 C <sub>18</sub> Cartridge	用水和 20% 甲醇先后洗柱 Water, followed by 20% MeOH	70% MeOH acidified with trifluoroacetic acid 90% 甲醇 90% MeOH				Zhao et al. 2006
鱼组织冻干样 Lyophilized fish tissue	HLB 小柱 HLB (0.5g)	5% 甲醇 5% MeOH	甲醇 MeOH	硅胶/plus 硅胶柱 Silica gel/plus silica gel tandem cartridges	甲醇 MeOH	70% 甲醇 70% MeOH	Xie and Park 2007
蚌鲜样 Fresh mussel	葡聚糖凝胶柱 Sephadex LH-20 column		甲醇 MeOH				Chen et al. 1993
鱼组织鲜样 Fresh fish organs	C <sub>18</sub> 小柱 C <sub>18</sub> Cartridge	20% 甲醇 20% MeOH	甲醇 MeOH				Magalhães et al. 2001, 2003
鱼组织鲜样 Fresh fish tissues	C <sub>18</sub> 小柱 C <sub>18</sub> Cartridge		80% 甲醇 80% MeOH				Mohamed et al. 2003, Mohamed and Hussein 2005
鱼肝脏鲜样 Fresh fish liver	C <sub>18</sub> 小柱 C <sub>18</sub> Cartridge	用水和 10% 甲醇 先后洗柱 Water, followed by 10% MeOH	甲醇 MeOH				Ernst et al. 2005

样品 Samples	第1次净化(除亲水性杂质) The first clean-up (eliminate hydrophilic impurities)			第2次净化(除疏水性杂质) The second clean-up (eliminate hydrophobic impurities)			文献 Reference
	萃取柱 Extraction column	除杂质冲洗 Rinse of impurities	洗脱 MC Elution of MC	萃取柱 Extraction column	除杂质冲洗 Rinse of impurities	洗脱 MC Elution of MC	
鱼组织鲜样 Fresh fish tissues	C <sub>18</sub> 小柱 C <sub>18</sub> Cartridge (0.5 g)	先用 PBS(磷酸盐缓冲液)、水和 25% 甲醇 冲洗, 然后用 25% MeOH 洗柱	甲醇 MeOH	C <sub>18</sub> 小柱 C <sub>18</sub> Cartridge	除杂质冲洗	洗脱 MC	Cazenave et al. 2005
鱼鲜样 Fresh fish	*IAC 小柱 IAC Cartridge	先用 PBS(磷酸盐缓冲液)、水和 25% 甲醇 冲洗, 然后用 25% MeOH 洗柱	80% 甲醇 (含 4% 的醋酸) 80% MeOH containing 4% (1/1) acetic acid				Lawrence and Menard 2001
人肝脏和血清、鱼组织鲜 样 Human liver and serum, fresh fish organs 人血清	C <sub>18</sub> 小柱 C <sub>18</sub> Cartridge	用水和 20% 甲醇先 后洗柱	甲醇 MeOH				Carmichael et al. 2001, Azevedo et al. 2002, Sore et al. 2004
Human serum 大白鼠肝和肾脏鲜样 Fresh rat liver and kidney	HLB 小柱 HLB Cartridge *MSPD 萃取 *MSPD Extraction	Water, followed by 20% MeOH 30% 甲醇 30% MeOH 二氯甲烷 Dichloromethane	甲醇 MeOH 甲醇或 70% 甲醇 MeOH or 70% MeOH				Hilborn et al. 2005 Ruiz et al. 2005

#IAC 小柱: 免疫亲和色谱小柱 #IAC cartridge: immunoaffinity chromatography cartridge

\*MSPD 萃取: 基体分散固相萃取(碳十八键合相硅胶填料为分散剂) \*MSPD: Matrix solid-phase dispersion (C<sub>18</sub> bonded silica as dispersant)

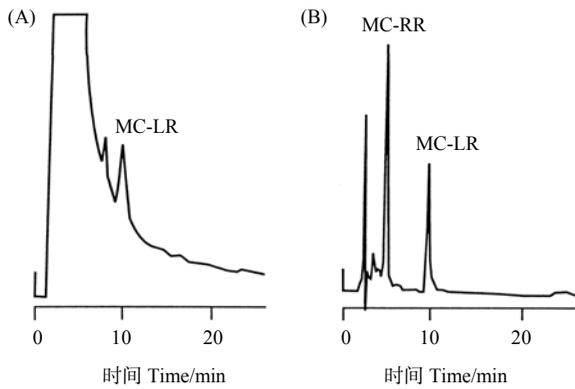


图 2-1 分别注射了 5  $\mu\text{g}$  MC-RR 和 MC-LR 的小白鼠肝细胞溶质萃取液的 HPLC 色谱图  
(引自 Kondo et al. 1996)

(A) 经过热变性、链霉菌蛋白酶消解以及 ODS 柱纯化后的萃取液; (B) 通过免疫亲和柱进一步纯化后的萃取液

Fig. 2-1 HPLC profiles of a cytosol extract from mouse liver spiked with 5  $\mu\text{g}$  each of MC-RR and MC-LR (Cited from Kondo et al. 1996)

(A) Extract after heat-denaturation, pronase digestion, and ODS silica gel cleanup; (B) Extract after further immunoaffinity purification

## 2. 组合 SPE 柱方法

### (1) ODS 柱+硅胶柱

Tsuji 等(1994)在单独使用 SPE 柱的基础上,建立了将 ODS 柱和硅胶柱组合起来使用的方法,证实能有效地除去湖水中的杂质。此法的基本步骤是将溶于 100%甲醇中含 MC 的溶液,加在硅胶小柱上,用 100%甲醇洗脱以除去一些脂溶性杂质,再用极性更强的溶剂(70%甲醇)洗脱和收集 MC。Watanabe 等(1997)以及后来的一些研究基于此方法测定了多种水生动物体内的 MC 含量(图 2-2)。但是这一方法的回收率不是很高(60%~70%)(表 2-4)。

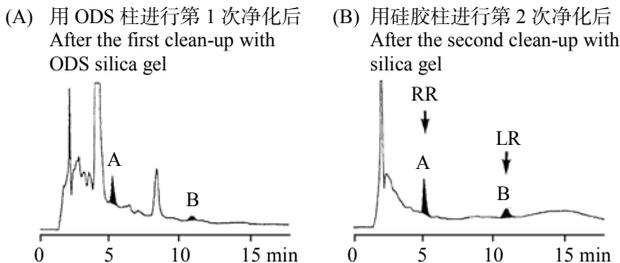


图 2-2 圆顶珠蚌肝胰腺用 ODS 柱进行第 1 次净化(A)和用硅胶柱进行第 2 次净化(B)的 HPLC 色谱图(检测波长 238 nm)(引自 Watanabe et al. 1997)

Fig. 2-2 High performance liquid chromatograms monitored at 238 nm and measured for the hepatopancreas of the freshwater mussel *Unio douglasiae* after the first clean-up with ODS silica gel (A) and the second clean-up with silica gel (B) (Cited from Watanabe et al. 1997)

## (2) HLB + 硅胶柱/plus 硅胶柱

Xie 和 Park(2007)通过比较各种不同小柱的加标回收率(表 2-2),建立了将 HLB 柱和硅胶柱/plus 硅胶柱(silica gel/plus silica gel tandem cartridge)组合起来使用的方法,不仅能有效地除去鱼组织中的杂质(图 2-3),而且鱼组织的 MC 加标回收率很高(表 2-4)。

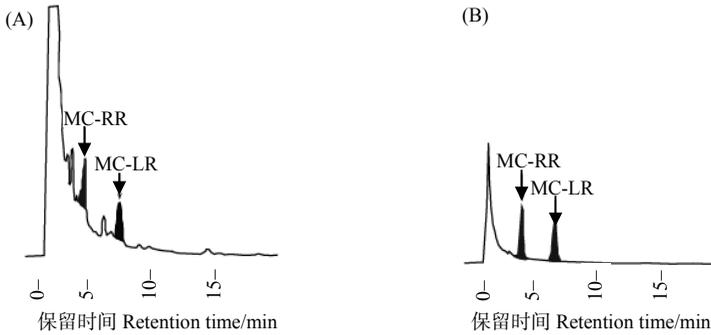


图 2-3 在波长 238 nm 处检测的鲢血液加标样品中的 MC-RR 和 MC-LR 的高效液相色谱图 (A) 首先经 HLB 净化后; (B) 再用硅胶柱/plus 硅胶柱纯化后(引自 Xie and Park 2007)

Fig. 2-3 High performance liquid chromatograms monitored at 238 nm and MC-RR and MC-LR measured for the spiked blood of sliver carp after the first clean-up with HLB(A) and the second clean-up with silica gel/plus silica gel tandem cartridges (B) (Cited from Xie and Park 2007)

表 2-4 动物组织加标 MC 回收率的比较

Table 2-4 A comparison of MC recovery in animal tissues spiked with standard MC

样品类型 Sample type	加标量 MC spiked/( $\mu\text{g/g}$ )	第 1 次净化 First clean-up	第 2 次净化 Second clean-up	测定 Detection	回收率 Recovery/% Mean (range) $\pm$ SD	文献 Reference
蚌冻干样 Freeze-dried mussel	5	No	No	LC-MS	MC-LR: 50(44~56) $\pm$ 4.2	Pires et al. 2004
鱼肝脏冻干样 Lyophilized fish liver	0.335	C <sub>18</sub> 柱 C <sub>18</sub> Column	No	HPLC-PDA	MC-LR : 68 N=6	Ibelings et al. 2005
蚌冻干样 Lyophilized mussel	0.335	C <sub>18</sub> 柱 C <sub>18</sub> Column	No	HPLC-PDA	MC-LR : 79	Ibelings et al. 2005
鱼组织(肝、肾、0.5 肌肉)干样 Lyophilized fish liver, kidney and muscle		C <sub>18</sub> 柱 C <sub>18</sub> Column	硅胶柱 Silica gel cartridge	HPLC-UV	MC-LR : 71(62~87) MC-RR : 63(47~82) N=15	Chen et al. 2006
鱼组织(肌肉 肝、血、肾) 干样 Lyophilized fish muscle, liver, blood and kidney		HLB	硅胶串接 plus 硅胶小柱 Silica gel/ plus silica gel tandem	HPLC-PDA	肌肉 Muscle MC-LR : 89.3 $\pm$ 0.1 MC-RR : 88.5 $\pm$ 0.8 肝脏 Liver MC-LR : 91.5 $\pm$ 1.4 MC-RR : 88.5 $\pm$ 2.3 血液 Blood	Xie and Park 2007

样品类型 Sample type	加标量 MC spiked/( $\mu\text{g/g}$ )	第 1 次净化 First clean-up	第 2 次净化 Second clean-up	测定 Detection	回收率 Recovery/% Mean (range) $\pm$ SD	文献 Reference
					MC-LR: 85.8 $\pm$ 1.6 MC-RR: 83.5 $\pm$ 1.9 肾脏 Kidney MC-LR: 97.5 $\pm$ 1.2 MC-RR: 95.5 $\pm$ 1.4	
鱼肝脏和肠道 鲜样 Fresh fish liver and intestine	0.5~3	No	No	HPLC-PDA LC/ESI/MS	肝脏 Liver (RSD 5~16) MC-LR: 87~99 MC-RR: 95~105 MC-YR: 72~104 肠道 Intestine (RSD 11~18) MC-LR: 68~73 MC-RR: 71~85 MC-YR: 69~76 N=5	Moreno et al. 2005
鱼鲜样 Fresh fish	0.1~0.5	IAC 小柱 IAC Cartridge	No	HPLC-UV	MC-LR: 81 (68~91) MC-RR: 73 (62~99) MC-YR: 79 (71~93) MC-LA: 77 (65~87) N=8	Lawrence and Menard 2001
鱼肝脏鲜样 Fresh fish liver	1 10 100	C <sub>18</sub> 小柱 C <sub>18</sub> Cartridge	No	HPLC-PDA Anti-Adda- ELISA PPIA	HPLC MC-LR: nd 44 $\pm$ 10.0 81 $\pm$ 6.8 Anti-Adda-ELISA MC-LR: 3 $\pm$ 1.3 58 $\pm$ 10.7 68 $\pm$ 1.8 PPIA MC-LR: nd 101 $\pm$ 25.8 93 $\pm$ 28.0 N=3~4	Ernst et al. 2005
鱼肌肉鲜样 Fresh fish muscle	0.5, 1.0	C <sub>18</sub> 小柱 C <sub>18</sub> Cartridge	No	HPLC-UV	MC-RR: >80	Cazenave et al. 2005
大白鼠肝和肾 鲜样 Fresh rat liver and kidney	0.15, 1, 10	MSPD 萃取 MSPD extraction	No	LC/ES/MS	肝脏 Liver MC-LR: 40.5~67.0 MC-RR: 40.5~62.5 MC-YR: 45.5~87.0 肾脏 Kidney MC-LR: 57.0~74.5 MC-RR: 54.5~60.5 MC-YR: 52.5~59.0	Ruiz et al. 2005

nd: 未检测出 not detectable

### 三、动物体内 MC 含量的分析技术

#### 1. 物理化学检测法

动物体内 MC 含量最常用的检测方法为高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)。此外还有液质联用(liquid chromatography/mass spectrometry, LC/MS)。

##### (1) HPLC

HPLC 是 20 世纪 60 年代末发展起来的一种高分辨分离分析技术,采用细柱、窄分布的填料制成的紧密的填充柱(常用填料平均粒度 5  $\mu\text{m}$ )、高压溶剂输送系统和高灵敏度的检测器,具有分离效能高、分析速度快、检测灵敏度高等特点(张君仁和臧恒昌 2002, 盛龙生等 2003)。

在 HPLC 的分离模式中,大多采用键合相色谱法,即将极性或非极性基团化学键合到硅胶基质上作为固定相。分离的原理是基于化合物在固定相和流动相间的分配;相对而言,色谱系统由极性固定相和非极性流动相组成,称为正相色谱(normal-phase chromatography, NPC),反之,由非极性固定相和极性流动相组成的色谱系统称为反相色谱(reverse-phase chromatography, RPC),反相 HPLC 常用 RP-HPLC 或 RPC 缩写(盛龙生等 2003)。

在 HPLC 流出物的在线检测中,最常用的检测器是紫外(UV)检测器,现在一般采用可变波长(分光光度)或二极管阵列(photo-diode array, PDA)检测器。

##### 1) HPLC-UV

紫外检测器在 MC 检测中的运用最为广泛。紫外检测器的光源通常用氙灯,工作波长 190~400 nm。大多数 MC 在 238 nm 波长处出现最大吸收峰,而一些含芳香氨基酸的 MC(如含有色氨酸的 MC-LW)在较低的波长 222 nm 处出现最大吸收峰(Lawton et al. 1994, 1995),因此可将紫外检测器设定在上述波长处对 HPLC 流出物进行检测。但是,样品萃取物中的其他化合物也有可能在上述波长处有吸收,因此,从定性判断某种 MC 是否存在的角度来看,HPLC 的测定结果只能提供暂定的信息;由于 HPLC 依赖于保留时间的确定,对 MC 的定量来说,需要已知浓度的标准样品(当然这也为定性提供了更多的信息)(Nicholson and Burch 2001)。由于 MC 具有相近的吸收系数(absorption coefficient)(Watanabe et al. 1988, Harada et al. 1990),因而在用 238 nm 波长进行检测时具有相似的灵敏度,这样能根据某个已知的 MC 标样来较准确地估算总 MC 浓度(Nicholson and Burch 2001)。有报道指出,塑料容器中常用的添加剂可污染样品,能随 MC 一起被洗脱下来并在 238 nm 波段处产生足够的吸收,从而影响了测定结果(Ikawa et al. 1999),因此在使用 HPLC 测定 MC 时,要尽量避免使用塑料容器或者需检查其适用性(Nicholson

and Burch 2001)。

## 2) HPLC-PDA

PDA 检测器在 MC 检测中的运用也十分常见。使用 PDA 检测器,可在一次进样后,同时采集不同波长下的色谱图,因而有利于选择最佳检测波长(盛龙生等 2003)。但是运用该方法来区分不同 MC 的能力仍然非常有限,因为大多数 MC 的最大吸收波长为 238 nm,而仅少数含有色氨酸的 MC 在 222 nm 波长处出现最大吸收峰。对现有的 70 多种 MC 来说,现在还不可能建立起一个确定的光谱库(definite spectral library),这也是目前用这一方法确认未知 MC 的最大的限制因素(Harada et al. 1999)。

### 流动相的洗脱方式——等度洗脱和梯度洗脱

典型的 HPLC 分析使用反相 C<sub>18</sub> 硅胶柱(reverse-phase C<sub>18</sub> silica column)。使用一定比例水(溶剂 A)和甲醇(溶剂 B)的流动相进行等度洗脱(Isocratic elution)(Watanabe et al. 1997, Yokoyama and Park 2002, 2003, Ozawa et al. 2003, Xie et al. 2004)。在等度洗脱中,流动相中甲醇和水的比例一般为 58:42(Yokoyama and Park 2002, 2003, Ozawa et al. 2003, Xie et al. 2004, 2005)或 56:44(Watanabe et al. 1997)

复杂样品的分析常使用梯度洗脱(gradient elution):即具有两种或两种以上不同极性的溶剂,在分离过程中按一定程序连续地改变,以改变流动相的配比和极性。在梯度洗脱中,最常用的是二元溶剂系统(A 和 B),其中强溶剂 B(如甲醇)的浓度随运行过程增加(张君仁和臧恒昌 2002)。在梯度洗脱的初期,流动相中 B 溶剂所占比例小,随着强溶剂 B 所占比例在梯度洗脱过程中逐步增加,保留较强的成分依次洗脱出来,直至强保留成分流出色谱柱,使目标组分得到更为有效的分离(盛龙生等 2003)。

在 MC 的检测中,有些研究使用了梯度洗脱(图 2-4)(Chen et al. 2005, Chen and Xie 2005a, b, Ernst et al. 2005),如将水溶液中的甲醇浓度从 50%(V/V)逐步提高到 70%(V/V),以检测 MC-LR、MC-YR 和 MC-RR(Chen et al. 2005, Chen and Xie 2005a, b)。此外,较宽的梯度比例可以涵盖足够的极性范围以检测极性变化很大的各种 MC(Harada et al. 1999)。

### 流动相 pH 的调节

MC 由氨基酸组成,而氨基酸由于氨基(—NH<sub>2</sub>)和羧基(—COOH)的存在呈现酸性或碱性,因而 MC 存在不同程度的酸碱性。例如,MC-LR 有两个游离的羧基和一个游离的氨基,根据游离氨基酸的测定数据,这 3 个可解离基团的 pK<sub>a</sub> 值分别为 2.09、2.19 和 12.48(Chang 1981)。当溶液的 pH 等于化合物的 pK<sub>a</sub> 时,化合物半解离;在 pK<sub>a</sub>±1.5 的范围内,化合物在色谱柱上的保留因子 *k* 随 pH 的变化而变化,超过此 pH 范围,化合物完全解离或不解离,*k* 随 pH 的变化很小。因此,与中性化合物相比,改变流动相的 pH,可控制酸、碱性化合物的色谱峰间的距离,而对中性化合物,pH 对 *k* 的影响甚小(盛龙生等 2003)。

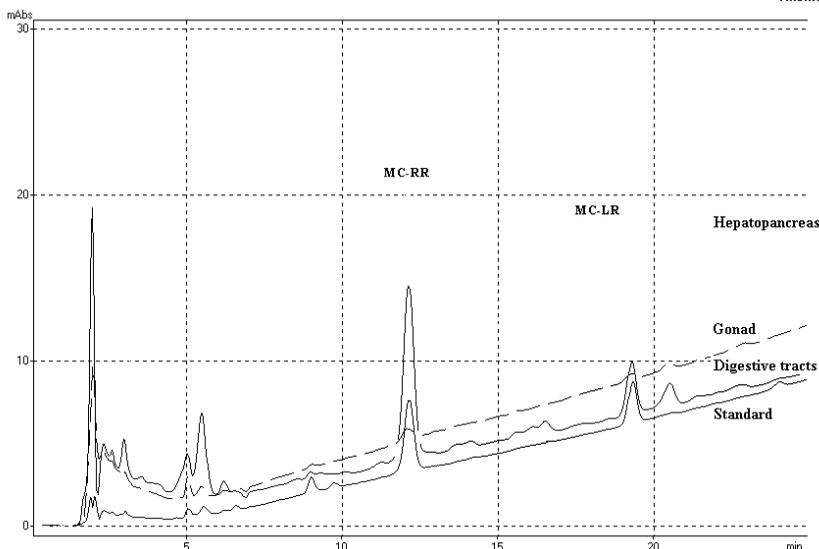


图 2-4 标样 MC-LR 和 MC-RR 以及 2003 年 6 月从巢湖采集的铜锈环棱螺肠道、肝胰腺和性腺萃取物的色谱图比较 (引自 Chen et al. 2005)

将水溶液中的甲醇浓度在 25 min 中从 50%(V/V) 逐步提高到 70%(V/V), 流速为 1 mL/min

Fig. 2-4 A comparison of the chromatograms (monitored at 238 nm) of the standard MC-LR and MC-RR, the extracts of digestive tracts, hepatopancreas and gonad of the snail *Bellamya aeruginosa* collected from Lake Chaohu in June 2003 (Cited from Chen et al. 2005)

A gradient starting at 50% (V/V) aqueous methanol with TFA was increased to 70% (V/V) in 25 min at a flow rate of 1 mL/min

由于键合相硅胶 Si—C 键的不稳定性(如 pH>9 时, 溶解度显著增加), 使用的环境 pH 应控制在 2~8(刘国诠和余兆楼 2001)。因此, 在对 MC 的 HPLC 分析中, 对固定相 pH 的调节, 只能在游离羧基的  $pK_a$  附近。在已有的研究中, 通常是在流动相(溶剂 A 和 B)中加入 0.05 mol/L 的磷酸缓冲液(Phosphate buffer)将 pH 调节至 3 左右(Yokoyama and Park 2002, 2003, Ozawa et al. 2003, Xie et al. 2004, 2005), 或加入 0.05% 的三氟乙酸(TFA)(Watanabe et al. 1997, Chen et al. 2005, Chen and Xie 2005a, b)。

由于反相色谱中, 流动相的极性大于固定相的极性, 洗脱次序为极性大的组分先洗脱(保留因子  $k$  小), 而极性小的组分后洗脱( $k$  大)。最后在 238 nm 或 200~300 nm (使用 PDA 检测器时)波长收集数据(Harada et al. 1999)。

## (2) LC/MS

质谱法是在真空系统中, 通过对样品所生成的气态离子质量数及其强度的测定, 进行成分和结构分析的方法(盛龙生等 2003)。质谱仪一般由真空系统、进样系统、离子源、质量分析器和计算机控制与数据处理系统(工作站)等部分组成(刘国诠和余兆楼 2001)。用一定的方法使样品分子转变为气态离子, 对于有机化合物, 如果在离子化过程中接受了过多的能量, 新生的分子离子(molecular ion)会进一步

裂解，生成各种碎片离子(fragment ion)；质谱法所得的信息是离子的质量数及其强度，通常以离子的质量数及其所带电荷的比值(质荷比， $m/z$ )为横坐标，强度为纵坐标制成质谱图(mass spectrum)。

早期的质谱法采用电子轰击(electron impact, EI)和化学离子化(chemical ionization, CI)技术，通常只能测定相对分子质量 500 以下的小分子化合物；后来出现快原子轰击质谱法(fast atom bombardment mass spectrometry, FABMS)，用动能为数千电子伏特的原子(氦原子)轰击以甘油为基质的样品溶液，产生质子化的分子 $[M+H]^+$ 进行质谱分析，可分析相对分子质量达数千的多肽；近年来，出现两种质谱新技术——基质辅助激光解吸离子化质谱法(matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry, MALDI-MS)和电喷雾离子化质谱法(electrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS)，MALDI 可用于相对分子质量高达数十万的蛋白质质谱测定，并可用于混合物分析和结构测定。ESI 由于形成多电荷离子，故可用常规质谱仪，如四极质谱仪分析高分子质量的化合物，也是 HPLC 或毛细管电泳(CE)与质谱联用的一种较好的接口技术；由于 MALDI 和 ESI 的出现，使“古老”的飞行时间质谱仪(time-of-flight mass spectrometer, TOFMS)得到了新生，此外，离子阱(ion trap)的发展催生出新一代的离子阱质谱仪(ion trap mass spectrometry, ITMS)和傅里叶变换离子回旋共振质谱仪(Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, FTMS)等新一代质谱仪(盛龙生等 2003)。

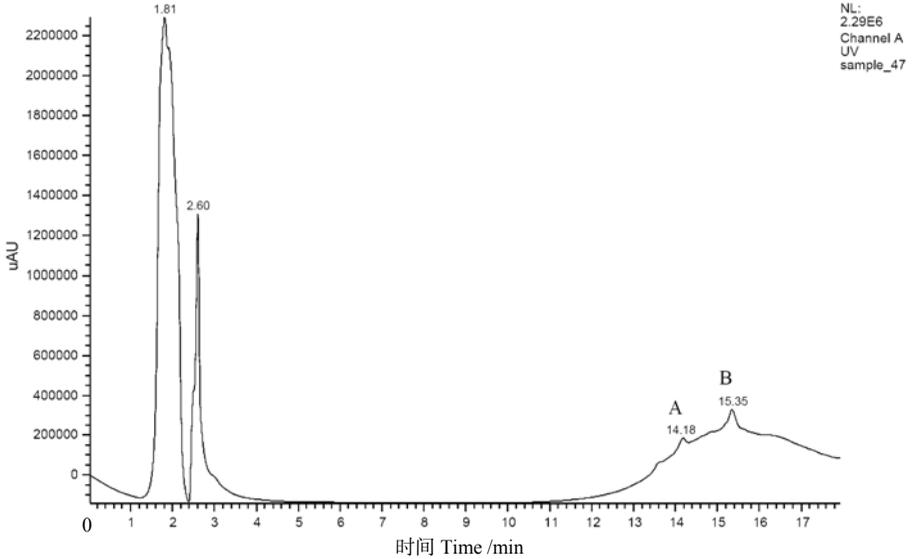
一方面，HPLC 可分离分析的化合物范围远较气相色谱(GC)为大，包括热不稳定、极性及大分子化合物；另一方面，现代 GC 具有很高的柱效及分离效能，至今 HPLC 仍相形见绌，因此 HPLC 色谱峰可能包含未分离成分，需要更灵敏、更专属的检测器，所以液相色谱-质谱法(LC/MS)得到广泛重视；LC 与 MS 的接口主要是大气压离子化接口(API interface)，包括 APCI、APPI 和 ESI，而其他接口如热喷雾(thermospray, TSP)、FAB、LSIMS 和 LC 的接口现在应用较少。离子束(particle beam)接口采用 EI 和 CI 离子源，只能用于小分子并受极性和热稳定的限制(盛龙生等 2003)。

运用 LC/MS 对动物器官中的 MC 的定性确认已有很多，例如，用 Frit-Fab LC/MS 确定了一种软体动物(圆顶珠蚌)肝胰腺中的 3 种 MC(MC-RR、MC-LR、MC-YR)的存在(Watanabe et al. 1997)，用 ESI LC/MS 确定了鱼类(Xie et al. 2004, 2005)、螺类(Chen et al. 2005)和虾类(Chen and Xie 2005a)各种器官中 MC 的存在。如根据总离子流色谱图(total ion chromatogram)、质荷比  $m/z=520$  处的质谱图以及  $[M+2H]^{2+}$  为 520 的特征碎片峰的存在，可以推断峰 A 来源于 MC-RR，同理可以推测峰 B 来源于 MC-LR(图 2-5)。

在动物体内 MC 的定量检测中，LC/MS 的应用远不及 HPLC 和 ELISA 广泛，最近才开始有研究运用该技术对动物体内的 MC 含量进行定量测定，所使用的质

谱仪包括三级四极杆质谱仪(triple quadrupole mass spectrometer)(Pires et al. 2004)和电喷雾离子化质谱仪 ESI-MS(Moreno et al. 2005, Ruiz et al. 2005)。最近, Chen 等(2006)同时用 HPLC-UV 和 ESI LC/MS<sup>2</sup> 对太湖鳊鱼各种器官中的 MC-RR、MC-LR 和 MC-YR 进行了测定, 发现对上述 3 种 MC, 两种方法测定值的相关性均为极显著( $P < 0.01$ )。

(A) RT: 0.03 – 17.92 SM: 11G



(B) RT: 0.00 – 22.24 SM: 11G

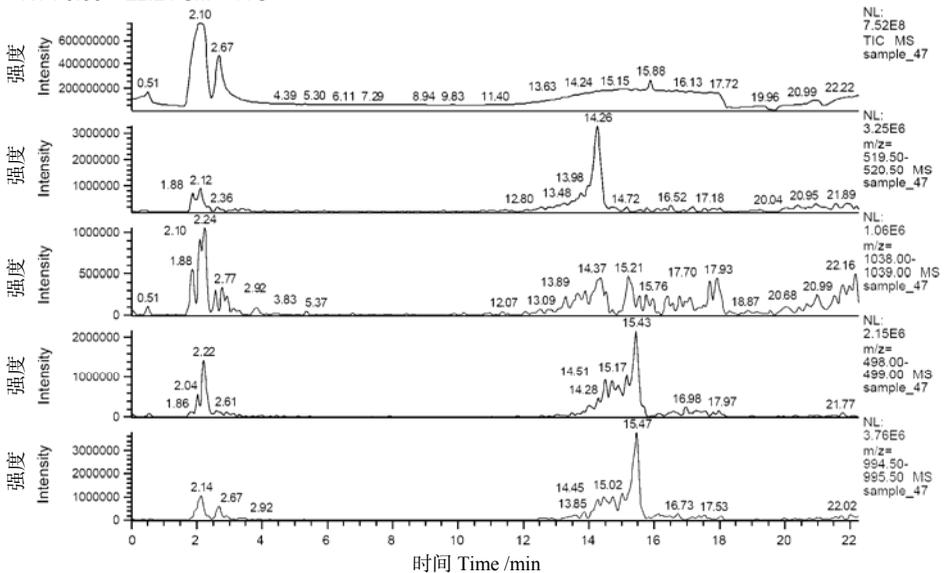


图 2-5

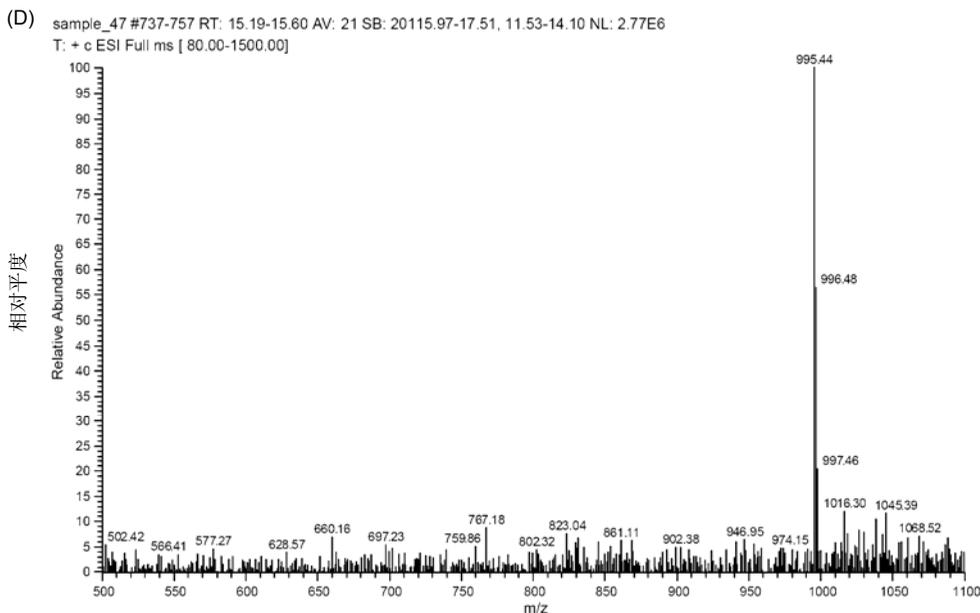
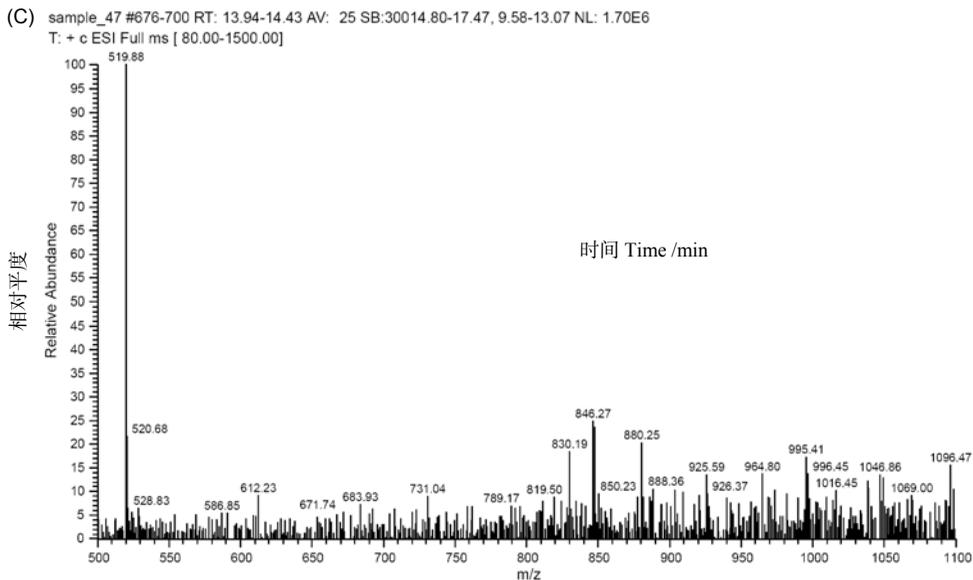


图 2-5 续 2003 年 10 月从巢湖采集的秀丽白虾肝胰腺中 MC 的 ESI LC/MS 分析  
(引自 Chen and Xie 2005a)

(A) 在波长为 238 nm 处检测的高效液相色谱图; (B) 质荷比  $m/z$  为 520、1038、498 和 995 处检测的质谱图;  
(C) 14.26 min 时的 ESI 质谱图(MC-RR); (D) 15.47 min 时的 ESI 质谱图(MC-LR)

Fig. 2-5 ESI LC/MS analysis of MC in the hepatopancreas of the shrimp *Palaemon modestus* from Lake Chaohu in October 2003(Cited from Chen and Xie 2005a)

(A) high performance liquid chromatogram monitored at 238 nm; (B) mass chromatograms monitored at  $m/z$  520, 1038, 498 and 995; (C) ESI mass spectrum at 14.26 min (MC-RR); (D) ESI mass spectrum at 15.47 min (MC-LR)

### (3) MMPB 法

MMPB(2-甲基-3-甲氧基-4-苯基丁酸, 2-methyl-3-methoxy-4-phenylbutanoic) MMPB 方法主要是基于 MC 的氨基酸残基 Adda 的特殊化学性质。由于所有的证据都表明 Mdma 残基是 MC 和 PPase 共价连接的场所(图 2-6)(Robinson et al. 1991a,b, Moorhead et al. 1994, Bagu et al. 1995, Goldberg et al. 1995, MacKintosh et al. 1995, Runnegar et al. 1995, Craig et al. 1996), 因此, Adda 残基无论在游离的还是与 PPase 结合的 MC 中都是一样的(Williams et al. 1997b)。

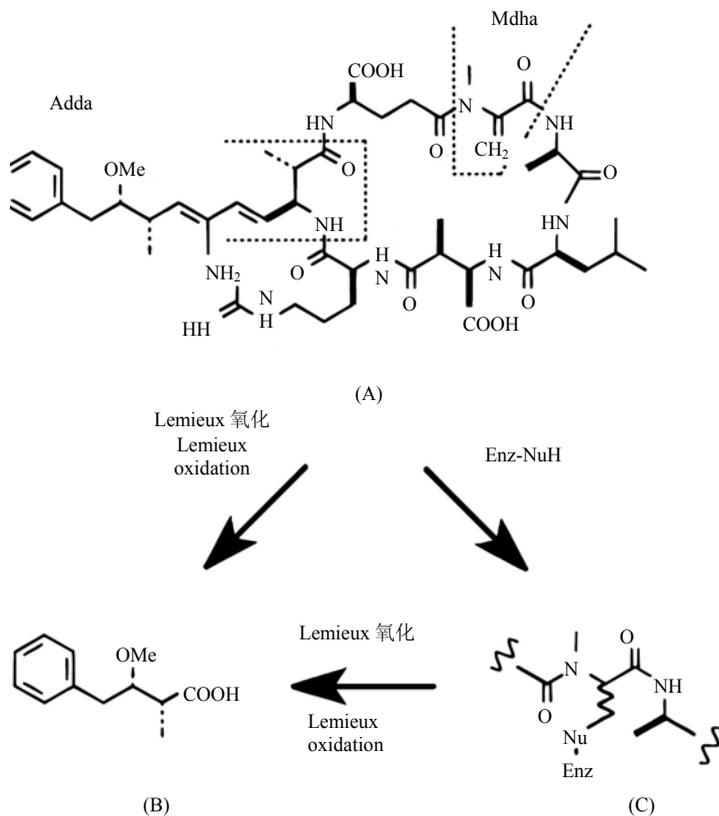


图 2-6 通过 Lemieux 氧化从 MC-LR (A) 或 MC-LR 与 PPase-MC 的共价结合体 (C) 获得 MMPB (B) 的示意图(引自 Williams et al. 1997b)

Fig.2-6 Production of MMPB (B) through Lemieux oxidation of MC-LR (A) or MC-LR and PPase-MC covalent complex (C) (Cited from Williams et al. 1997b)

已有的研究表明, 将 MC-LR 或将从自然的水华蓝藻中用甲醇萃取出的 MC-LR 进行氧化(如 Lemieux 氧化)可得到大量的 MMPB(图 2-6B)(Sano et al. 1992)。MMPB 容易用乙醚(ether)从 MC 的 Lemieux 氧化反应中提取出来, 并可在较低的浓度下用 GC/MS 检测(Williams et al. 1997b)。

MMPB 测定法只能提供所有类型 MC(包括结合和非结合)的总量, 而无法区

分 MC 的种类,也不能区分 MC 的结合态和非结合态。但是在室内毒性实验中,使用已知种类的 MC,并结合其他的检测方法(如 HPLC、LC/MS 等),可获得 MC 在动物体内分布与代谢的重要信息。MMPB 在 MC 和节球藻毒素中同时出现(但不会在其他自然发生的代谢产物中出现),因而在有节球藻毒素存在的情况下,MC 将被高估。

基于 Lemieux 氧化的 MMPB 测定法也存在过程繁杂的缺陷,如需萃取、纯化、氧化、去除反应试剂的后处理,以及适用于 GC 和 HPLC 的衍生化(derivatisation)等(Harada et al. 1999)。但对藻类样品,可通过臭氧分解(ozonolysis)来取代 Lemieux 氧化,这样大大缩短了形成 MMPB 的时间,能完全省掉萃取、纯化以及其他过程(Harada et al. 1996b)。

迄今为止,在动物体内 MC 的检测中,MMPB 法的应用十分有限,主要是用于确定动物组织中共价结合的 MC 与游离的(甲醇可萃取)MC 的比例(Williams et al. 1997b, c, Pires et al. 2004),但所得的结果差异很大:腹腔注射 MC-LR 后 7 h,鲑鱼肝脏中 MC-LR 总负荷的 75%以上无法通过甲醇萃取-PPase 法检测出(Williams et al. 1997b);当贻贝(*Mytilus edulis*)摄取铜绿微囊藻的干藻粉 3 天后,其体内甲醇可萃取 MC 不到 MC 总负荷的 0.1%(Williams et al. 1997c);从加拿大不列颠哥伦比亚省的 Cypress 岛采集的珍宝蟹幼蟹中,MC 总负荷中只有 0.007%可通过甲醇萃取-PPase 法检测出,但在 Maple 湾的鲑鱼网箱养殖厂采集的珍宝蟹幼蟹,用甲醇萃取-PPase 法测出 MC-LR 的存在,而用 Lemieux 氧化-GC/MS 法则没有检测出 MC-LR(Williams et al. 1997b);斑纹蛙摄食微囊藻 1 周后,其体内共价结合的 MC-LR 仅占总 MC-LR 量的 1%,而经过 2 周的摄食,则上升到 38.3%(Pires et al. 2004)。

## 2. 免疫检测法

在动物体内的 MC 检测技术中,酶联免疫检测法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)的应用很广,仅次于 HPLC 法。

ELISA 是免疫分析技术(immunoassay)的一种,其原理是用不同的酶来标记抗原(antigen)或抗体(antibody),以测定酶的活性来显示标记抗原抗体结合的情况。抗原是指能刺激免疫活细胞产生抗体,并在体内产生特异性反应的物质,通常,抗原相对分子质量越大,立体结构越复杂,其免疫原性越好,人们把具有免疫原性的物质称为完全抗原,只有完全抗原注入动物体内后才能激起动物产生抗体,而相对分子质量小于 1000 的物质,则一般无抗原性。若将小分子物质同某些大分子载体物质(蛋白质或多肽)结合后,就可使其具有抗原性,注入动物体内后能诱发机体产生对该物质专一的抗体,这类物质称为半抗原(hapten)。几乎所有的蛋白质都可作为半抗原的结合载体,现在最常用的是动物的血清白蛋白,由于牛血清白蛋白连接基团多,来源方便,应用最为广泛(王少云 2002)。

抗体是由抗原免疫动物得到的。抗体分为单克隆抗体(monoclonal antibody)和多克隆抗体(polyclonal antibody),前者为来源于单一纯化的细胞系的抗体,产生的交叉免疫程度很低,后者来源于多细胞的抗体,易受结构相近的其他化合物交叉免疫干扰;单克隆抗体通过杂交瘤技术(hybridoma technique)制备,多克隆抗体常用于酶联免疫吸附测定(Stewart and Ebel 2000)。

Kfir 等(1986)将 MC-LA 共价连接到多熔素(polylysine)和胞壁酰二肽(muramyl dipeptide)形成一个包含有半抗原、载体和嵌入佐剂的复合物,然后将该复合物免疫小白鼠,通过杂交瘤技术,首次成功制备出 MC-LA 的单克隆抗体,该抗体属于小白鼠免疫球蛋白亚类的 IgM(mouse immunoglobulin subclass IgM),并发现该抗体对 MC-LA 以外的 6 种异构体的结合效率相同,因而展示出一种用免疫手段检测 MC 的快速而简单的途径。

Chu 等(1989)发展了 ELISA 的实用技术,其原理为从兔身上获得的抗牛血清白蛋白的多克隆抗血清(polyclonal antisera)可与 MC-LR 共价结合,该抗血清与 MC-LR、MC-RR 和 MC-YR 有很好的交叉反应(cross reactivity)。

由于灵敏度高、特异性强及操作容易,ELISA 技术是目前最被推崇的一种对 MC 进行快速粗筛的方法(Harada et al. 1999)。

### 3. 生物化学检测法

由于 MC 能强烈地抑制蛋白磷酸酶(PP-1 和 PP-2A)的活性(Honkanen et al. 1990, MacKintosh et al. 1990, Yoshizawa et al. 1990),依据这种抑制的程度可对 MC 进行定量测定,称之为蛋白磷酸酶抑制法(protein phosphatase inhibition assay, PPIA)。这种定量的基础是测定在磷酸酶和其抑制剂(如 MC)存在的情况下,磷酸化蛋白(phosphorylated protein)的磷释放量;因此,MC 对蛋白磷酸酶的抑制可通过测定  $^{32}\text{P}$  标记的底物( $^{32}\text{P}$  radiolabelled substrate)产生的放射性标记的磷来定量(Nicholson and Burch 2001)。

在一些研究中,已成功应用与液相色谱联用的 PPIA 法(liquid chromatography-linked protein phosphatase inhibition assay)检测加拿大海水围网养殖中的大西洋鲑鱼肝脏中的 MC(Andersen et al. 1993)以及加拿大海域采集到的软体动物体内的 MC(Chen et al. 1993)。

PPIA 法虽然灵敏度高,但存在如下缺陷:① $^{32}\text{P}$  的半衰期短(约 14 天),因此需随时制备被标记的蛋白质,而这样的蛋白质也无商业化产品,因而需要复杂的制备过程;②在制备过程中,需要使用标记的 ATP 和商品酶,而二者都十分昂贵;③一般的实验室无进行放射性检测的条件(Nicholson and Burch 2001)。

此外,许多天然毒素,如节球藻毒素(nodularin)、大田软海绵酸(okadaic acid)、斑蝥素(cantharidin)、花萼海绵诱癌素(calyculin A)和互变霉素(tautomycin)等都能抑制蛋白磷酸酶的活性(Honkanen et al. 1994),因此,在运用 PPIA 法检测 MC 时,

须与其他专一性较好的方法(如HPLC)进行比较,以免MC的含量被高估(Nicholson and Burch 2001)。

#### 4. 各种检测方法敏感性和选择性的关系

关于动物体内 MC 的分析检测技术,选择性和敏感性是选择分析方法的两个重要指标(图 2-7)。生物检测选择性和敏感性均最低,一般用作粗筛。例如,小白鼠的生物测试是一种重要的粗筛手段,它不仅在数小时内给出样品的总毒素潜力(total toxic potential),还能检测肝毒素和神经毒素(neurotoxin)(WHO 1998)。而实际上,生物测试多用于藻类样品 MC 的初筛,极少用于对动物体内 MC 的初筛(可能由于动物体内的 MC 含量一般较低,难于收集足够量 MC 用于小白鼠的毒性试验)。核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)和质谱,如 FAB、LSI(液相二次离子化 liquid secondary ion),虽然选择性高,但是灵敏度较低,一般用作藻类样品中毒素的结构分析,而极少用于动物样品中 MC 的分析。ELISA 和 PPIA 的灵敏度最高,但选择性较低,ELISA 被广泛地用于动物体内 MC 的定量测定。HPLC 和 MMPB 的选择性和敏感性均为中等水平, HPLC 是动物体内 MC 的最常用的定量检测技术(表 4-4、表 5-3 和表 6-6),而 MMPB 法的使用十分有限。LC/MS 选择性和灵敏度均较高,不仅用于动物体内 MC 的定性,最近开始应用于定量检测。

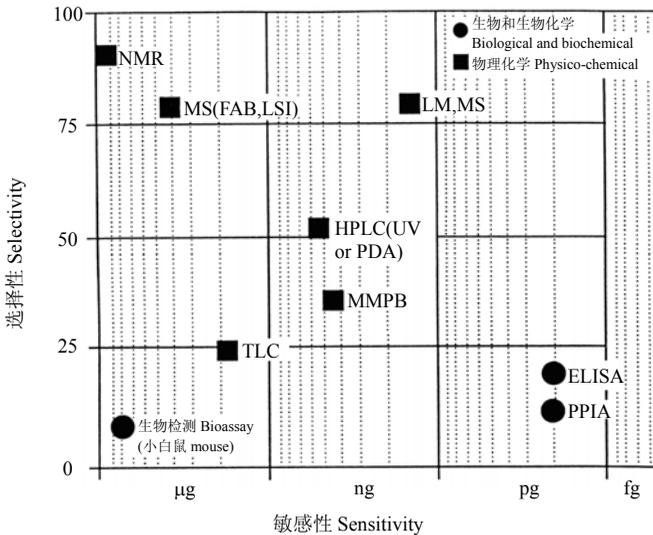


图 2-7 MC 分析方法的敏感性和选择性的关系(引自 Harada et al. 1999)

Fig. 2-7 Relationship between sensitivity and selectivity of analytical methods for MC (Cited from Harada et al. 1999)

# 第三章 鱼类对 MC 摄取和清除的实验研究

鱼类直接或间接地以浮游植物为食，因而在出现有毒蓝藻水华的水体时容易摄取和累积 MC。而鱼类又是人类最重要的食物之一，被 MC 污染的鱼类对人类的健康造成潜在威胁，因此有关 MC 在水生动物体内分布与迁移转化规律的实验研究以鱼类最多。相关的研究涉及：①冷水性肉食性鱼类——大西洋鲑鱼和虹鳟；②底栖动物食性鱼类——鲤鱼；③杂食性鱼类——鲫鱼；④浮游植物食性鱼类——鲢、鳙和罗非鱼。

## 一、鱼类实验研究背景分析

### 1. 实验鱼类概况

大西洋鲑鱼(*Salmo salar*)(图 3-1)和虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)(图 3-2)是全世界鲑鱼中最重要的养殖种类(Purser and Forteach 2003)。大西洋鲑鱼为洄游性鱼类，在淡水河流中产卵，经过 6~24 个月后回到海洋；自然分布于北大西洋及俄罗斯、葡萄牙、冰岛、丹麦、加拿大和美国等国的海岸，摄食较大的浮游动物、水生昆虫、甲壳类及鱼类。虹鳟喜栖息于冷水、清洁的河流与湖泊，自然分布于北美，但被广泛引种到各大洲，主要摄食水生昆虫、浮游生物、甲壳类、鱼卵和小鱼。



图 3-1 大西洋鲑鱼图(引自 LandBigFish <http://www.landbigfish.com>)

Fig. 3-1 Photo of the Atlantic salmon *Salmo salar* (Cited from LandBigFish <http://www.landbigfish.com>)

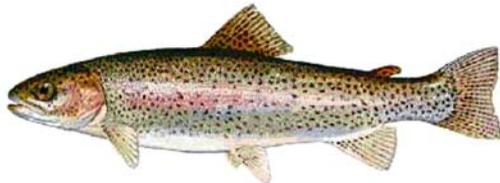


图 3-2 虹鳟图(引自 U.S. Fish and Wildlife Service, <http://www.fws.gov>)

Fig. 3-2 Photo of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*(Cited from U.S. Fish and Wildlife Service, <http://www.fws.gov>)

鲤鱼(*Cyprinus carpio*)(图 3-3)养殖数世纪以来在欧洲的池塘养殖中一直占有主导地位；直到今天，它依然在东欧的池塘养殖中占绝对优势(FAO 2000)。鲤鱼起源于中国、日本和中亚，可能是第一个在世界范围内被广泛引种的鱼类，大约在 19 世纪中叶，经历了全球范围内的一系列的引种后，它几乎遍及了气候条件允许其生存的所有地方(Welcomme 1988)。鲤鱼为杂食性，摄食各种底栖动物、有机碎屑甚至藻类(湖北省水生生物研究所鱼类研究室 1976)。



图 3-3 鲤鱼图(引自刘建康和何碧梧 1992)

Fig. 3-3 Photo of the common carp *Cyprinus carpio* (Cited from Liu and He 1992)

鲫鱼(*Carassius auratus*)(图 3-4)分布于我国各地(除青藏高原外)的江河、湖泊、池塘及沟渠等水体中，为杂食性鱼类，主要以硅藻、丝状藻类、水草碎片和腐殖质等为食，也食甲壳动物(伍献文等 1982)。



图 3-4 鲫鱼图(引自刘建康和何碧梧 1992)

Fig. 3-4 Photo of the crucian carp *Carassius auratus* (Cited from Liu and He 1992)

银鲫(英文名 silver crussian carp, 学名 *Carassius auratus gibelio*)为鲫的近缘亚种，广泛分布于欧、亚大陆的温带水域，我国盛产于东北的黑龙江-辽河流域，新疆额尔齐斯河流域。异育银鲫是中国科学院水生生物研究所的鱼类育种专家于 1976~1981 年成功培育出的一种养殖新品种，它是以黑龙江方正县天然雌核发育的银鲫为母本、以江西兴国红鲤为父本培育出来的，具有异精雌核发育特性，生长速度快(为普通鲫的 2~3 倍)，产量高，当年繁殖苗种养到年底，一般可长到 250g 以上，目前已在全国 20 多个省市推广养殖。

鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)[图 3-5(A)]的自然分布的北界至中俄交界的黑龙江，分布南界到中越交界的红河。鳙(*Aristichthys mobilis*)[图 3-5(B)]的自然分布

区则北仅分布到海河平原，南至珠江平原(李思忠和方芳 1990)。显然，鲢的分布范围较广，跨越热带(红河)和北温带(黑龙江)。鲢被引种到 71 个国家，鳙被引种到 51 个国家，而 80%以上的国家间引种发生在 20 世纪 60~80 年代，绝大多数是为了水产养殖(谢平 2003)。可以说，没有任何其他鱼类像鲢、鳙这样传播得如此之快及如此之广，仅仅用了 30 多年的时间，就从亚洲的原产地传播到了非洲、北美洲、南美洲、大洋洲和欧洲；在世界内陆水体鱼产量中鲢位居榜首，鳙位居第三(Opuszynski and Shireman 1995)。鲢、鳙是典型的滤食性鱼类，主要摄食浮游植物、浮游动物和碎屑等(Xie 1999, 2001, 谢平 2003)，并可用来控制有毒蓝藻水华(Xie and Liu 2001)。

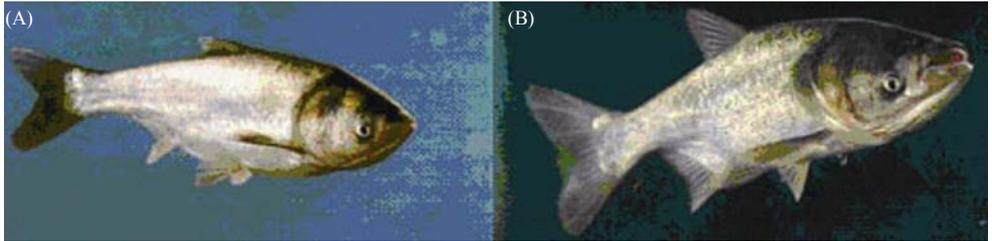


图 3-5 鲢(A)和鳙(B)图片(引自中国科学院水生生物研究所和上海自然博物馆 1982)

Fig. 3-5 Photos of the silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* (A) and the bighead carp *Aristichthys mobilis* (B) (Cited from Institute of Hydrobiology and Shanghai Natural Museum 1982)

罗非鱼(图 3-6)为热带淡水鱼类，是当今养殖最成功的鱼类之一，目前全球的年产量已超过一百万吨，其中中国的产量占 51%(FAO 2001)。罗非鱼的自然分布区为非洲(马达加斯加岛除外)及中东的部分地区，罗非鱼广泛生活在缓流的河流、泛滥平原的水池、沼泽、湖泊及潟湖等生境；水温低于 16 °C 即停止生长，低于 10 °C 则无法生存；罗非鱼植物食性，摄食浮游植物、底栖藻类、水生高等植物等(Suresh 2003)。尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)为最重要的养殖品种。



图 3-6 红胸罗非鱼图片(引自中国罗非鱼论坛, <http://www.dragonsflying.com>)

Fig. 3-6 Photo of Redbreast tilapia (Cited from Forum on Tilapia in China, <http://www.dragonsflying.com>)

## 2. 研究背景分析

关于 MC 在大西洋鲑体内分布与迁移转化的实验研究主要见于加拿大学者(Williams et al. 1995, 1997a, 1997b), 由于大西洋鲑为冷水性肉食性鱼类, 这类研究实验水温较低(10 ℃), 主要通过腹腔注射使 MC 进入鱼体内。在近海, 有毒蓝藻的发生对水产养殖的影响也受到人们的关注。大西洋鲑的海水围网(seawater purse net)养殖在加拿大的不列颠哥伦比亚省和美国的华盛顿州是一种重要的商业养殖, 而与 MC-LR 相关的鲑鱼肝脏损伤则常发生于海水围网养殖的第一个夏季, 在此期间, 鲑鱼大量摄食浮游动物及其他自然生物, 而从这些导致鲑鱼肝脏损伤的海水围网养殖水体中采集到的桡足类和幼蟹体内均检测出 MC-LR, 因此, 鲑鱼“围网病”导致的鲑鱼死亡被归结于鲑鱼摄取了取食含 MC 蓝藻的无脊椎动物(Andersen et al. 1993, Williams et al. 1995)。Williams 等(1995, 1997a, 1997b)主要通过研究 MC 在大西洋鲑鱼体内分布与迁移转化规律, 阐明鲑鱼“围网病”的成因, 以及评估鲑鱼体内的 MC 污染对人类消费可能造成的影响。

关于 MC 在虹鳟体内分布与迁移转化的实验研究主要见于欧洲学者(Tencalla and Dietrich 1997, Bury et al. 1998)。在苏格兰的一淡水湖——Loch Leven, 随着含肝毒素的蓝藻水华的衰亡和裂解, 出现濒临死亡的棕鳟(英文名 Brown trout, 学名 *Salmo trutta*), 并呈现出由 MC 引起的肝脏损伤及严重的鳃损伤等症状(Bury et al. 1998)。Tencalla 和 Dietrich(1997)认为, 在集约化养殖情况下或有毒蓝藻水华严重发生的小型湖泊和池塘中, 避食或减少摄食活动可能难以有效地避免藻类食性鱼类和其他鱼类因蓝藻毒素引起的急性中毒。因此, 有毒蓝藻水华将威胁到罗非鱼、鲤鱼及鲑鱼养殖业, 而这些养殖业在为不断增加的世界人口提供营养中有重要作用。由于虹鳟为肉食性鱼类, 在这类研究中, 通过腹腔注射或灌喂使 MC 进入鱼体内。加拿大学者(Williams et al. 1995, 1997a, 1997b)研究了腹腔注射的 MC 在大西洋鲑鱼体内的动力学特征, 而欧洲学者(Tencalla and Dietrich 1997, Bury et al. 1998)则研究了灌喂的 MC 在虹鳟体内的动力学特征, 拟弄清 MC 是否能穿过肠壁进入体内及其可能的机制。

关于 MC 在鲫鱼体内累积规律的研究见于比利时学者(Malbrouck et al. 2003, 2004a, b), 这些研究只是将鲫鱼作为实验材料, 关注的问题是比较禁食(fasted)与投喂(fed)条件下 MC-LR 对鲫鱼的毒性。在哺乳动物中, 活体(*in vivo*)实验已证实, MC-LR 对饥饿小白兔的损伤更严重(Miura et al. 1991), 但其机制还不清楚。Malbrouck 等(2003, 2004a, b)的实验包括活体和分离的肝细胞两类, 通过腹腔注射使 MC 进入鱼体内, 实验水温较大大西洋鲑鱼的实验有所提高(15 ℃), 在机制方面, 关注肝脏毒性增加与肝糖原储积(glycogen store)和氧化胁迫(oxidative stress)的关系。我国学者 Zhao 等(2006)利用有毒微囊藻和人工鱼饲料制成的混合饲料, 研究了 MC 在异育银鲫主要器官中的累积规律。

关于 MC 在鲢体内累积规律的研究见于中国和日本学者的合作研究(Xie et al. 2004)。一方面, 鲢直接摄食浮游植物甚至有毒蓝藻, 而且被广泛用于人类消费, 因此需考虑 MC 引起的食物安全性问题。另一方面, 鲢被用于直接控制蓝藻水华(被称为非经典生物操纵), 其解毒机制值得关注。由于鲢主要滤食浮游植物, 因此 Xie 等(2004)在其进行的室内实验中直接投喂新鲜的有毒微囊藻(采自一池塘), 实验水温较大西洋鲑鱼及鲫鱼的实验有所提高(15.5~25.3 °C, 平均 20.7 °C)。

关于 MC 在罗非鱼体内累积规律的研究见于巴西和埃及学者(Soares et al. 2004, Mohamed and Hussein 2005)。罗非鱼(如 *Tilapia rendalli* 和 *Oreochromis niloticus*) 在 1956 年被引入巴西用于水产养殖(Gurgel and Fernando 1994), 在巴西 Rio de Janeiro 市的 Jacarepaguá 湖(一浅咸水潟湖), 由于富营养化程度不断增加, 出现了严重的有毒蓝藻水华(主要是 *M. aeruginosa*), 在过去的 10 年间鱼总产量下降, 目前的主要鱼类为红胸罗非鱼(*Tilapia rendalli*), 在该种鱼肝脏、肌肉及内脏团中检测到 MC 的存在, 其肝脏呈现出血(hemorrhagic)症状(Magalhães et al. 2001)。罗非鱼的摄食机制十分复杂, 被认为具有吞食(suction feeding)、视觉摄取(visual feeding)、嚼食(biting)和刮食(grazing)等的混合模式(Beveridge and Baird 2000)。因此可以像 Xie 等(2004)对鲢的实验那样进行投喂。在 Soares 等(2004)的实验中, 将 *Microcystis aeruginosa* 与琼脂及商业鱼饲料混合制成胶质状饲料来投喂。实验水温较高达(23.5±0.5) °C。

埃及是世界罗非鱼第二大生产国(FAO 2001), 据说在古埃及时代就有罗非鱼的养殖(Suresh 2003)。在埃及罗非鱼是大多数人最喜食的淡水鱼类, 其产量占到鱼总产量的 37%(Elghobashy 2001), 其中主要是 *O. niloticus* 和 *O. aureus*(均为埃及的土著鱼类)。在埃及的一个出现有毒微囊藻水华的渔场, 在 *O. niloticus* 的肠道、肝脏、肾脏及肌肉中检测出 MC, 并大大高于 WHO 制定的允许摄取标准(Mohamed et al. 2003)。Mohamed 等(2005)将从上述渔场中捕出 *O. niloticus* 放入桶中, 研究了 MC 在 *O. niloticus* 体内 MC 的清除机制, 实验水温达 25 °C。

## 二、放射性同位素标记法

### 1. 腹腔注射 [<sup>3</sup>H]-MC-LR(大西洋鲑鱼)

Williams 等(1995)通过腹腔注射氚标记的 MC-LR 的二氢化合物(tritium-labeled dihydromicrocystin-LR), 研究了 MC-LR 在大西洋鲑鱼中的分布和迁移转化规律。由于甲基脱氢氨基酸(*N*-methyl-dehydroamino acid)可被硼氢化钠(sodium borohydride)还原, 因此, 可将 MC 的甲基脱氢丙氨酸(*N*-methyl-dehydroalanine, Mdha)残基用硼氢化钠还原。用 MC-LR(5.4 mg)和氚标记的硼氢化钠(sodium borohydride [<sup>3</sup>H]) (1.6 mg, 14.2 mCi)制备 2 mg 的氚标记的 MC-LR 的二氢化合物([<sup>3</sup>H]-MC-LR), 其放射性强

度为 32.6  $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ 。MC-LR 纯化自从加拿大 Alberta 的 Little Beaver 湖采集而来的形成水华的蓝藻细胞(主要是铜绿微囊藻)。

将 $[\text{H}^3]$ -MC-LR 溶解在 0.5 mL 的二甲基亚砜(dimethylsulphoxide, DMSO)中, 再加入 9.5 mL 0.8%的无菌盐水。用于腹腔注射的大西洋鲑鱼共 13 尾, 体重为 80~160 g, 注射的 $[\text{H}^3]$ -MC-LR 剂量为 1mg/kg。注射完毕后, 将大西洋鲑鱼放置在两个装有盐水(盐分含量为 30 ng/kg)的容积为 52.5 L 的水族箱中。水族箱置于黑暗处并充氧, 实验期间不投饵, 水温为 10  $^{\circ}\text{C}$ 。注射后, 分别于 2 h、5 h、22 h 和 46 h 随机取鱼解剖分析各器官中的氘代二氢 MC-LR( $[\text{H}^3]$ dihydroMC-LR)的含量。

在同样剂量(1 mg/kg)的腹腔注射条件下, 未标记的 dihydroMC-LR 与 MC-LR 对大西洋鲑鱼引起的鱼肝脏损伤类似; 同样, 蛋白磷酸酶抑制实验表明, MC-LR 和 dihydroMC-LR 的  $\text{IC}_{50}$  值也正好一致(0.1~0.2 nmol/L); 这也就是说, MC-LR 和 dihydroMC-LR 的中毒性病理特性(toxicopathic property)相似。

当 $[\text{H}^3]$ -MC-LR 被注射到大西洋鲑鱼体的腹腔后, 毒素在 2 h 后集中分布在肝脏、幽门垂和肠道; 在 5 h 和 22 h 后, 集中分布在肝脏; 在 46 h 后集中分布在肝脏和肾脏(图 3-7)。最大毒素浓度出现在注射后 5 h 的肝脏中, 为注射量的 (4.9 $\pm$ 0.5)% (图 3-8)。整个鱼体对氘标记的吸收率在 2 h、5 h、22 h 和 46 h 的吸收率分别为(67.9 $\pm$ 7.3)%、(78.4 $\pm$ 3.1)%、(54.5 $\pm$ 6.6)%和 12.2%。

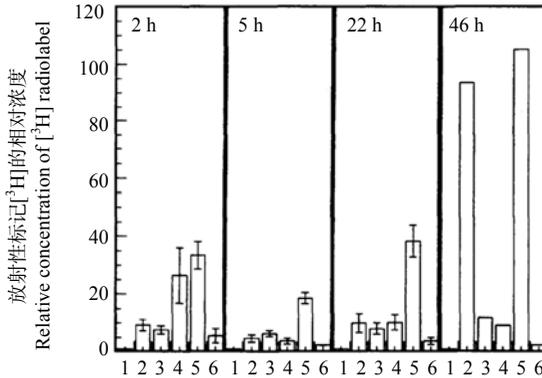


图 3-7 在接受亚致死量(1 mg/kg)的 $[\text{H}^3]$ -MC-LR 的腹腔注射后, 大西洋鲑鱼组织中放射性同位素标记的相对分布 (引自 Williams et al. 1995)

在注射后 2 h、5 h、22 h 和 46 h 后分别取组织。肌肉的放射能=1。所显示的值为平均值 $\pm$ S.D., 样本数  $n=4$  (但在 46 h,  $n=1$ )。1 为肌肉; 2 为肾脏; 3 为鳃; 4 为幽门垂和肠道; 5 为肝脏; 6 为剩余的部分

Fig. 3-7 Relative distribution of radiolabel in Atlantic salmon tissue after a sublethal i.p. injection (1 mg/kg) of  $[\text{H}^3]$ -MC-LR (Cited from Williams et al. 1995)

Tissues were removed at 2 h, 5 h, 22 h and 46 h post-injection. Flesh radioactivity=1. Values are mean $\pm$ S.D.,  $n=4$  (except at 46 h,  $n=1$ ). 1, flesh; 2, kidney; 3, gills; 4, pyloric caeca and intestine; 5, liver; 6, remaining carcass

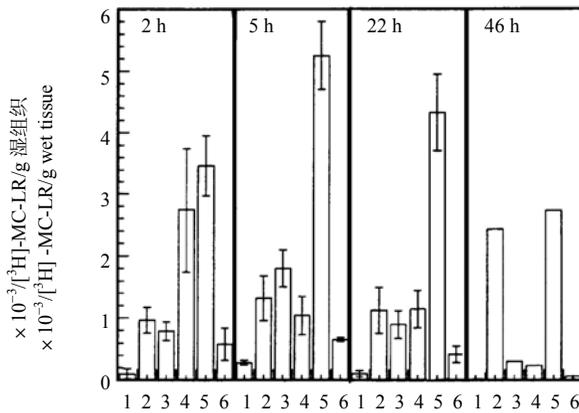


图 3-8 在接受亚致死量(1 mg/kg)的 $[^3\text{H}]$ -MC-LR 的腹腔注射后, 大西洋鲑鱼组织中放射性同位素标记的特定分布 (引自 Williams et al. 1995)

在注射后 2、5、22 和 46 h 后分别取组织。所显示的值为平均值 $\pm$ S.D., 样本数  $n=4$ (但在 46 h,  $n=1$ )。

1 为肌肉; 2 为肾脏; 3 为鳃; 4 为幽门垂和肠道; 5 为肝脏; 6 为剩余的部分

Fig. 3-8 Specific distribution of radiolabel in Atlantic salmon tissue after a sublethal i.p. injection (1 mg/kg) of  $[^3\text{H}]$ -MC-LR (Cited from Williams et al. 1995)

Tissues were removed at 2, 5, 22 and 46 h post-injection. Values are mean $\pm$ S.D.,  $n=4$  (except at 46 h,  $n=1$ ).

1, flesh; 2, kidney; 3, gills; 4, pyloric caeca and intestine; 5, liver; 6, remaining carcass

关于放射性同位素标记的 MC 在哺乳动物体内分布与迁移转化的实验研究较早(Falconer et al. 1986, Runnegar et al. 1986, Brooks and Codd 1987, Robison et al. 1989, 1990, Meriluoto et al. 1990, Lin and Chu 1994, Nishiwaki et al. 1994), 而 Williams 等(1995) 在鱼类中的研究是首次。Williams 等(1995)基于以下理由认为鱼类比陆生动物对 MC 的抗性要强得多: ① 大西洋鲑鱼的肝脏对放射性同位素标记的 MC-LR 的结合(incorporation)百分率远比小白鼠低, 如用氚标记的 MC-LR 注射到小白鼠的腹腔后, 1 h 和 6 h 后, 50%~67%集中分布于肝脏(Robison et al. 1989, 1990); ② 大西洋鲑鱼对毒素的清除比小白鼠快: 小白鼠注射 8 天后, 肝脏和其他残体(carass)中仍然保留有 50%和 8%的放射性标记(Robison et al. 1990); 而大西洋鲑鱼注射 46 h 后, 整个身体对放射性标记的保留率已不超过 13%。

Williams 等(1995)基于以下两点原因认为海水围网养殖的大西洋鲑鱼的鱼肉不会对人类的健康构成潜在威胁: ① MC-LR 在肉(flesh)中的含量很低, MC-LR 相对含量的最大值在肉中将不会超过肝脏含量的 1/20(可能更典型来说, 不足肝脏含量的 1/100); ② 达到市场出售大小(market-size)的大西洋鲑鱼可能不会暴露于高水平的 MC-LR, 因那时它们几乎只摄食商业饲料, 而不摄食浮游动物。可能正是由于这一研究结论, 自 Williams 等(1995, 1997a, 1997b)的研究之后, 就再也未见关于 MC 对北美海水围网养殖中的大西洋鲑鱼食用安全性影响的研究报道。

## 2. 腹腔注射 $^{14}\text{C}$ -MC-LR(大西洋鲑鱼)

MC 与 PP-1 和 PP-2A 的结合包括两步(Bagu et al. 1995, Craig et al. 1996): 首先是 MC 与 PP 的快速可逆的结合, 导致对催化活动的强烈(但可逆)阻碍作用; 第二步(发生在数小时的时间尺度上)是在 MC 的甲基脱氢丙氨酸(Mdha)残基与磷酸酶(phosphatase, PPase)的亲核位置(nucleophilic site)形成一个不可逆的共价连接(irreversible covalent linkage)。含还原的 Mdha 的 MC-LR 通过可逆的第一步反应能强烈地阻碍 PPase 的催化活力, 但不能与 PP-1 和 PP-2A 形成共价的络合物(covalent complex)。因此, Williams 等(1997a)认为, MC-LR 的二氢化合物 dihydroMC-LR 不是决定鲑鱼体内毒素真正分布和总负荷(total burden)的合适的毒素形态, 并用 $^{14}\text{C}$ 均匀标记的 MC-LR(uniformly  $^{14}\text{C}$ -labeled MC-LR)重新研究了 MC-LR 在鲑鱼体内的分布和清除规律。

$^{14}\text{C}$  标记的 MC-LR 制备于 1.33 L 用含  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (sodium  $^{14}\text{C}$ -bicarbonate)(2.5 mCi/4 L)的培养基培养的铜绿微囊藻。共得到 2 mg 的 MC-LR, 其比放射性(specific radioactivity)为 1.38  $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ 。将  $^{14}\text{C}$  标记的 MC-LR 溶解在 0.5 mL 二甲基亚砷(DMSO)中, 再加入 9.5 mL 0.8%的无菌盐水。用于腹腔注射的大西洋鲑鱼共 16 尾, 体重为 100~130 g, 注射的  $^{14}\text{C}$  标记的 MC-LR 剂量为 1 mg/kg。注射完毕后, 将大西洋鲑鱼放置在装有盐水的水族箱中。水族箱置于黑暗处并充氧, 实验期间不投饵, 水温为 10  $^{\circ}\text{C}$ 。注射 6 h 和 25 h 后, 将水族箱中的 2/3 的水换掉。注射毒素后, 分别于 2 h、5 h、24 h 和 43.5 h 随机取 4 尾鱼, 解剖分析各器官(肝脏、肌肉和其他部分)中的  $^{14}\text{C}$  标记的 MC-LR 的含量。对肝脏中的毒素含量采用两种不同的方法来测定: 一种是用 KOH 消解来测定  $^{14}\text{C}$  的放射性; 另一种是将肝脏用 MeOH 萃取后, 测  $^{14}\text{C}$  的放射性及进行 PPase 检测。

通过 KOH 消解来测定  $^{14}\text{C}$  的放射性的方法, 肌肉中的 MC-LR 含量在注射 2 h 后为(0.15 $\pm$ 0.02)  $\mu\text{g}/\text{g}$  鲜重组织, 5 h 后上升到(0.26 $\pm$ 0.04)  $\mu\text{g}/\text{g}$ , 43.5 h 后轻微回落到(0.24 $\pm$ 0.04)  $\mu\text{g}/\text{g}$ ; 肝脏与肌肉的 MC-LR 含量之比从 2 h 的 52:1 下降到 5 h 的 30:1、24 h 的 19:1 及 43.5 h 的 10:1。在其他组织, 2 h、5 h、24 h 和 43.5 h 后的 MC-LR 含量分别为(0.43 $\pm$ 0.04)、(0.42 $\pm$ 0.03)、(0.14 $\pm$ 0.02)和(0.07 $\pm$ 0.01)  $\mu\text{g}/\text{g}$ , 分别占总注射量的(40.7 $\pm$ 3.5)%、(39.3 $\pm$ 3.0)%、(13.2 $\pm$ 1.5)%和(6.1 $\pm$ 0.7)%。实验结束时水族箱中的水含有放射标记量的 57.8%, 而鱼组织含 37.9%, 加起来为注射总量的 95.7%。

注射后 5 h, 在肝脏中的 MC 总量(占注射总量的 16.6%)的 60%不能被 MeOH 萃取出(表 3-1), 24 h 和 43.5 h 后, 可被 MeOH 萃取出的 MC 量分别占肝脏中 MC 总量的 13.2%和 4.8%。此外, 注射后 5 h, 甲醇萃取释放出在 PPase 检测中有活性的放射性物质, 而 24 h 或以后, 甲醇萃取释放出放射性物质, 但在 PPase 检测中没有活性, 可能是由于代谢作用形成了无活性的代谢产物(inactive metabolite)。

表 3-1 放射性同位素经消解后在肝组织中的特定结合率及分别用  $^{14}\text{C}$  放射性测定法和 PPase 测定法检测甲醇萃取物中 MC-LR 含量的比较, 数值为 4 个样品的平均值 $\pm$ S.D.

Table 3-1 Specific incorporation of radiolabel in liver tissue upon digestion and comparison with that released by MeOH extraction when assayed by both the PPase assay and  $^{14}\text{C}$  counts. Values are means  $\pm$  S.D. obtained from quadruplicate animals

注射后时间 Time after injection	$^{14}\text{C}$ 消化结果 $^{14}\text{C}$ digestion results		甲醇萃取结果 MeOH extraction results	
	MC-LR 含量 $\mu\text{g MiLR tissue}$	占注射总量的 百分比 % of injected radiolabel detected	占注射总量的百分比 ( $^{14}\text{C}$ 法测定) % of injected radiolabel detected by $^{14}\text{C}$ counts	占注射总量的百分比 (PPase 法测定) % of injected radiolabel detected by PPase assay
2 h	9.29 $\pm$ 0.06	11.93 $\pm$ 0.17	5.97 $\pm$ 0.99	6.54 $\pm$ 0.87
5 h	9.84 $\pm$ 0.56	16.55 $\pm$ 0.85	6.98 $\pm$ 0.94	6.60 $\pm$ 0.61
24 h	4.35 $\pm$ 0.34	6.53 $\pm$ 0.54	0.86 $\pm$ 0.09	0.43 $\pm$ 0.06
43.5 h	2.15 $\pm$ 0.24	2.70 $\pm$ 0.31	0.13 $\pm$ 0.008	0.06 $\pm$ 0.005

(引自 Williams et al. 1997a) (Cited from Williams et al. 1997a)

与用氚标记的 MC-LR 的不同之处在于: ①在氚标记的 MC-LR 实验中, 肝脏中毒素含量的最大值为 4.9%, 远低于  $^{14}\text{C}$  标记的 MC-LR 实验(最大值为 16.6%); ②在氚标记的 MC-LR 实验中, 注射后 46 h 内, 肌肉中的毒素含量从注射后 5 h 的最大值 0.28  $\mu\text{g/g}$  减少了 10 倍(肝脏与肌肉中毒素含量之比超过 100 : 1); 而在  $^{14}\text{C}$  标记的 MC-LR 实验中, 注射后 43.5 h 之内, 肌肉中的毒素含量无显著变化, 肝脏与肌肉中毒素含量之比从注射后 2 h 的 52 : 1 降低到 43.5 h 的 10 : 1。

在 Williams 等(1997a)的研究中得出的两个重要结论是: ①在生物体内(*in vivo*), MC-LR 的大部分被结合 (tied-up), 最有可能是形成了 PPase-MC 的共价络合物, 阻止了其被甲醇萃取; ②本实验结果支持 Mdha 残基在 MC 的共价结合和代谢中十分重要的观点。

### 3. 灌喂 [ $^3\text{H}$ ]-MC-LR(虹鳟)

Bury 等(1998)通过灌喂的方式, 研究了  $^3\text{H}$ -MC-LR 在虹鳟鱼体内的分布和迁移转化规律。MC-LR 纯化自铜绿微囊藻 *Microcystis aeruginosa* PCC 7820, 然后参照 Eriksson 等(1990a)以及 Codd 和 Bell(1995a)用氚标记, 所得的  $^3\text{H}$ -MC-LR 的放射性强度为 247 mCi/mmol。虹鳟来自 Mill 学院孵化厂(Almondbank, Perthshire, Scotland), 暂养在盛有自来水的水族箱中, 每天按体重的 1%~2%投喂鲑鱼饲料, 水温条件 4~15  $^{\circ}\text{C}$ 。

#### (1) 灌喂后 $^3\text{H}$ -MC-LR 在组织中的分布

在虹鳟摄食大约 14 h 后, 从暂养的水族箱中移出 3 组(每组 6 尾)鱼进行麻醉。对其中的一组, 通过口腔填喂法(oral gavage)灌入含 0.64  $\mu\text{g } ^3\text{H}$ -MC-LR/kg 的 Cortland 盐水 100  $\mu\text{L}$ , 对另外的两组, 灌入等量的含 1  $\mu\text{g } ^3\text{H}$ -MC-LR/kg 和 5872  $\mu\text{g}$

MC-LR/kg 的盐水, 或者  $1.16 \mu\text{g } ^3\text{H-MC-LR/kg}$  和  $10 \text{ mmol/L}$  脱氧胆酸盐 (deoxycholate)。将鱼放置在  $100 \text{ L}$  的水族箱中恢复,  $24 \text{ h}$  后, 用过量的麻醉剂将其致死, 解剖并取各器官分析。

在肌肉和肝脏中检测到放射性, 但在脾脏和肾脏中没有检测出, 放射性主要存在于肝脏中(表 3-2)。添加脱氧胆酸盐并未显著影响  $^3\text{H-MC-LR}$  的分布。MC-LR 浓度  $1000$  倍的增加并没有显著改变  $^3\text{H-MC-LR}$  的百分比分布, 其结果是, 组织中 MC-LR 的浓度增加了近千倍。经过  $24 \text{ h}$ , 进入到消化道的  $^3\text{H-MC-LR}$  的大约  $0.3\%$  在肝脏和肌肉中检测到。也就是说, 如果 MC-LR 通过口腔填喂法进入虹鳟消化道, 那么被吸收的毒素的大部分累积在肝脏中, 还有少部分积累在肌肉中。

表 3-2 氚标记的微囊藻毒素  $^3\text{H-MC-LR}$  在虹鳟肝脏和肌肉中的分布

Table 3-2 Distribution of tritium radiolabelled MC-LR in the liver and muscle of rainbow trout

灌喂的毒素计量 Dose administered to gut ( $\mu\text{g MC-LR/kg}$ )	肝脏 Liver ( $\text{pg MC-LR/kg}$ )	肌肉 Muscle ( $\text{pg MC-LR/kg}$ )
$0.64 \pm 0.28$	$739 \pm 532 (0.17 \pm 0.43) \%$	$166 \pm 91 (0.11 \pm 0.04) \%$
$5873 \pm 2407$	$4.1 \times 10^6 \pm 1.9 (1.24 \pm 0.33) \%$	$1.2 \times 10^6 \pm 0.52 (0.05 \pm 0.04) \%$
$1.16 \pm 0.69 + 10 \text{ mmol/L}$ 脱氧胆酸盐 deoxycholate	$285 \pm 171 (0.66 \pm 0.47) \%$	$192 \pm 70 (0.08 \pm 0.02) \%$

在括号中的数字表示组织中分布的量占填喂量的百分比。数据为平均值 $\pm$ S.E.,  $n=6$ (引自 Bury et al. 1998)

Values in the parentheses indicate tissue distribution as percentage of the administered dose. Values are mean  $\pm$ S.E.,  $n=6$  (Cited from Bury et al. 1998)

关于 MC-LR 在哺乳动物和鸟类消化道中的传输的研究表明, 回肠(ileum)(小肠的最后部分, 位于十二指肠和空肠之后)是优先的吸收场所(Dahlem et al. 1989, Falconer et al. 1992), 而回肠是哺乳类胆盐再吸收(reabsorption)的场所(Lack and Weiner 1973, Frederick 1981)。以下事实表明, 哺乳动物和鸟类对 MC-LR 的吸收可能是通过胆盐传输载体(Bury et al. 1998)进行的: ①在胆盐或胆盐传输抑制剂存在的情况下, 分离的小白鼠肝细胞(rat hepatocyte)对 MC-LR 的吸收受阻(Eriksson et al. 1990a, Runnegar et al. 1995a); ②胆盐或胆盐传输抑制剂利福平(rifampicin)和溴磺酚酞(bromosulphophthalein)的存在可使小鸡的肠细胞(chicken enterocyte)免于遭受 MC-LR 诱导的畸形变化(Falconer et al. 1992)。而 Bury 等(1998)关于虹鳟的研究结果表明, 这一机制是否在鱼类中存在还无法确认。

## (2) 体外肠道 MC-LR 的摄取实验

实验前先让虹鳟摄食,  $18 \text{ h}$  后, 用过量的麻醉剂将其致死, 移出消化道, 然后用绷带(ligature)系住肠道的末端和胆管。再取消化道的幽门盲囊(pyloric caeca)、前后肠(anterior and posterior intestine)和直肠(rectum), 并挤出未消化的食物和粪便。用 Cortland 生理盐水将肠道内的粪便残余物洗净。在一组肠道中注入  $300 \mu\text{L}$  的盐水, 该盐水含有  $(408 \pm 15) \text{ pmol } ^3\text{H-MC-LR}$  加上下列组分之一:  $(262 \pm 17) \text{ pmol MC-LR}$ ,  $(1787 \pm 129) \text{ pmol MC-LR}$ ,  $(24\ 699 \pm 2127) \text{ pmol MC-LR}$ ,  $1 \text{ nmol/L}$  的乌本苷(ouabain)或无这些添加;

然后用绷带将直肠系住。将肠囊(intestinal sac)的表面用新鲜的盐水清洗两次以移去肠壁外面的<sup>3</sup>H-MC-LR, 再将肠囊转到3 mL已在15°C预热并充分充气的盐水中。分别在0 min、15 min、30 min、60 min和120 min取外面的盐水样品分析放射性强度。

结果表明, 在2 h的时间内, 从虹鳟肠囊的黏膜(mucosa)到绒毛膜(serosa)的<sup>3</sup>H-MC-LR(浓度为408~25 107 pmol, 图3-9)的体外运输没有达到饱和状态(图3-10), 运输率与肠内的MC-LR浓度呈直线关系。作为Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP酶抑制剂的乌本昔对MC-LR传输速率(直线回归的斜率)没有影响, 但是对直线回归的截距(intercept)有显著影响(图3-11)。

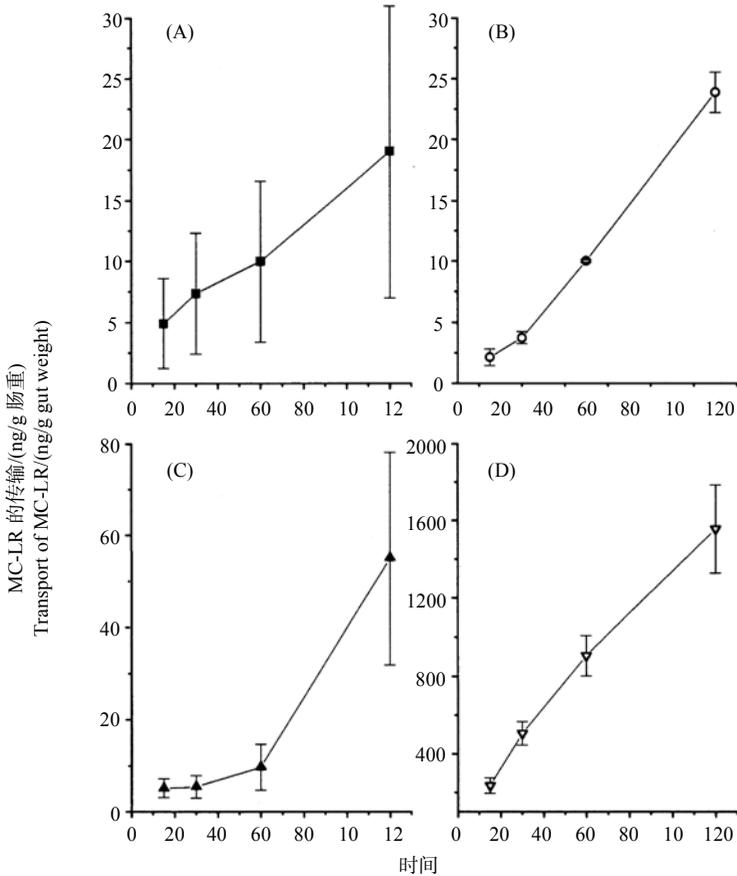


图3-9 在虹鳟肠道中注入不同浓度的MC-LR后, MC-LR从黏膜到绒毛膜的体外传输(引自 Bury et al.1998)

(A) (408±15) pmol; (B) (670±17) pmol; (C) (2195±129) pmol; (D) (25 107±2117) pmol MC-LR。

数据表示平均值±S.E.M., n=3

Fig. 3-9 *In vitro* transport of MC-LR from mucosa to serosa at different concentrations of MC-LR in rainbow trout intestine(Cited from Bury et al.1998)

(A) (408±15) pmol; (B) (670±17) pmol; (C) (2195±129) pmol;

(D) (25 107±2117) pmol MC-LR. Values are mean ±S.E.M., n=3

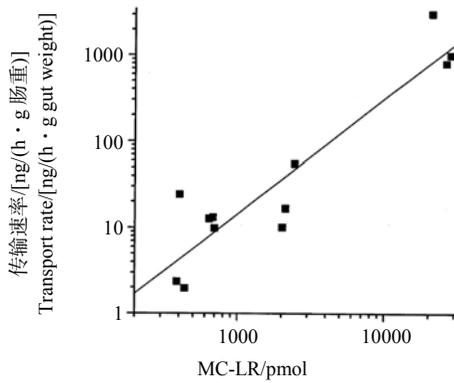


图 3-10 经过 2 h 的时间, MC-LR 从虹鳟肠囊的黏膜到绒毛膜的传输速率, 传输速率与肠内的 MC-LR 浓度呈直线关系( $r=0.714$ ,  $P=0.009$ )(引自 Bury et al. 1998)

Fig. 3-10 Transport rate of MC-LR to serosa of individual rainbow trout intestinal preparations after a 2 h incubation period in relation to initial mucosa toxin concentration. The line is derived from linear regression analysis and shows  $r=0.714$  and  $P=0.009$  (Cited from Bury et al. 1998)

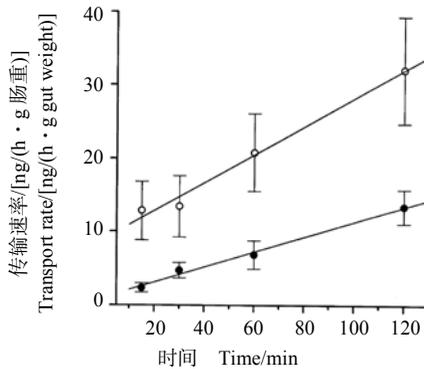


图 3-11 虹鳟肠道在经过乌本苷(1 mmol/L, 空心圆,  $n=6$ )处理或未经乌本苷处理(实心圆,  $n=5$ )情况下, MC-LR 传输的时间变化 (引自 Bury et al. 1998)

线性回归系数在对照组为  $y=1.18+0.10x$ ,  $R=0.996$ , 乌本苷处理组为  $y=8.98+0.19x$ ,  $R=0.994$ 。两组的斜率无显著差异, 但两组的截距之间差异显著( $P<0.05$ , ANOVA)

Fig. 3-11 Transport of MC-LR versus time by rainbow trout intestines treated with (1 mm d/L, open circles,  $n=6$ ) or without ouabain (closed circles,  $n=5$ ) (Cited from Bury et al. 1998)

Linear regression coefficients were control,  $y=1.18+0.10x$ ,  $R=0.996$ ; ouabain,  $y=8.98+0.19x$ ,  $R=0.994$ . There was no significant difference between the slopes. However, there was a significant difference between intercepts ( $P<0.05$ , ANOVA)

Bury 等(1998)认为, 虹鳟消化道对 MC-LR 的吸收不是通过  $\text{Na}^+$  依赖性的主动运输, 因为作为  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP 酶抑制剂的乌本苷的存在并没有对 MC-LR 的运输速率产生显著的影响, 但是不知为何乌本苷的存在增加了 MC-LR 的运输量。因此, 这暗示虹鳟消化道对 MC-LR 的传输至少部分是被动的或者与  $\text{Na}^+$  无关的主动的

过程,被动的运输意味着 MC-LR 可直接进入腹腔(peritoneal cavity),而通过口腔填喂法发现标记的 MC-LR 出现在肝脏和肌肉中的现象表明,至少部分毒素能通过消化道进入体内循环的血液(blood stream)。

### 三、MMPB 法和甲醇萃取法的比较

为了获得 MC 在鱼体内与磷酸酶共价连接的证据,Williams 等(1997b)运用两种方法——MMPB(Lemieux 氧化-GC/MS 测定)法和甲醇萃取-PPase 法测定了进行腹腔注射 MC-LR 的鲑鱼肝脏中的 MC-LR 含量。MMPB 为 MC 中 Adda 残基的氧化产物。

将 MC-LR 溶解在 0.5 mL 的二甲基亚砷(DMSO)中,再加入 9.5 mL 0.8%的无菌盐水。用于腹腔注射的大西洋鲑鱼共 19 尾,体重为 25~50 g,注射的 MC-LR 剂量为 2 mg/kg。注射完毕后,将大西洋鲑鱼放置在装有盐水(盐度为 30 ng/kg)的水族箱中。水族箱置于黑暗处并充氧,实验期间不投饵,水温为 10 ℃。注射毒素后,分别于 7 h(8 尾鱼)、25 h(3 尾鱼)、28.5 h(8 尾鱼)随机取鱼样,取肝脏并称重。在 7 h,取 2 尾分别处理,另 6 尾合并。在 25 h,1 尾单独处理,另 2 尾的样合并;在 28.5 h,所有鱼合并在一起处理。将鲑鱼肝组织用甲醇萃取后,用蛋白磷酸酶(PPase)抑制法测定 MC-LR 含量;另外,用 Lemieux 氧化法( $\text{KMnO}_4 + \text{NaIO}_4$ )得到 MMPB,再用 GC/MS 来测定,进而计算 MC-LR 的含量。

在体外(*in vitro*),将 18.1~497.5 nmol(肝组织注射 7 h 时的值在此范围内)的 MC-LR 通过穿刺(spiked)注入到鲑鱼肝组织中,用 Lemieux 氧化法测得 MMPB 的回收率(recovery)为 85%~95%,而当注入的 MC-LR 含量小于 15 nmol(肝组织注射 25 h 时的值在此范围内)时,回收率开始下降。对 MMPB 标样,在保证得到一致标定(consistent calibration)的条件下,用 GC/MS 检测时单个进样(single injection)的检测限为 10~20 ng(0.05~0.10 nmol)。但是,对组织样品来说,在有两种以上的物质具有几乎同样的滞留时间及掩盖了离子峰的情况下,分析的灵敏性就会打折扣,这就是肝组织注射 28.5 h 后的样品的情况,虽然有非常少量的 MC-LR 存在,但是准确的浓度计算几乎不可能。

对鲑鱼肝脏样品来说,注射 7 h 和 25 h,用 Lemieux 氧化-GC/MS 法测定的值比用甲醇萃取-PPase 法测定的值分别提高 6 倍和 12.4 倍(表 3-3)。但是由于 25 h 的样品的含量已接近 GC/MS 的检测限,注射后 25 h 的结果只能作为参考。注射 7 h,肝脏中 MC-LR 总负荷的 75%以上无法通过甲醇萃取-PPase 法检测出,而在 7~25 h 期间出现的肝脏中 MC-LR 总负荷的明显降低暗示着 Adda 残基在进一步的代谢过程中大量地被改变、破坏和(或)排泄掉了。

表 3-3 用 Lemieux 氧化-GC/MS 法和蛋白磷酸酶抑制法对鲑鱼肝组织中的 MC-LR 含量<sup>1)</sup>测定结果的比较

Table 3-3 Comparison of the Lemieux oxidation-GC/MS method and Ppase assay for the analysis of MC-LR in salmon liver tissues<sup>1)</sup>

样品 Samples	Lemieux 氧化-GC/MS 法测定结果		甲醇萃取-PPase 法	
	Lemieux oxidation and GC/MS results		MeOH extraction and PPase assay results	
	MC-LR 含量 µg MC-LR/g of tissue	占注射总量的百分数 % of injected detected	MC-LR 含量 µg MC-LR/g of tissue	占注射总量的百分数 % of injected detected
1×7 h	118.1±11.6	34.3±3.4	26.29	8.1
1 × 7 h	61.0±16.5	31.4±8.5	13.88	7.1
6 × 7 h	101.8±8.3	32.1±2.6	3.85	1.2
2 × 25 h	24.7±8.6	7.6±2.6	2.27	0.70
1 × 25 h	13.8±6.0	4.8±2.1	0.85	0.29
8 × 28.5 h	nd <sup>2)</sup>	nd <sup>2)</sup>	0.26	0.09

1) 为在代表性浓度范围标定的 3 个样品的平均值±SD; 2) nd 表示未能检测出

1) Values are mean±SD obtained from triplicate calibrations within a representative concentration range;

2) nd, not detectable (引自 Williams et al. 1997b) (Cited from Williams et al. 1997b)

Williams 等(1997a)用<sup>14</sup>C 标记的 MC-LR 对鲑鱼进行腹腔注射的结果也表明, 注射后 5 h, 肝组织中存在的<sup>14</sup>C 标记的 MC-LR 的约 60%是不能被甲醇萃取的。用<sup>14</sup>C 标记的研究结论与用 Lemieux 氧化-GC/MS 法和甲醇萃取-PPase 法进行比较研究所得的结论是一致的和互为补充的(图 3-12)。两种实验方法都表明, 鲑鱼肝组织中的 MC 负荷的测定都不能仅仅依靠甲醇萃取, 推测可能是由于在 MC 和 PP-1 和 PP-2A 之间形成了共价络合物。

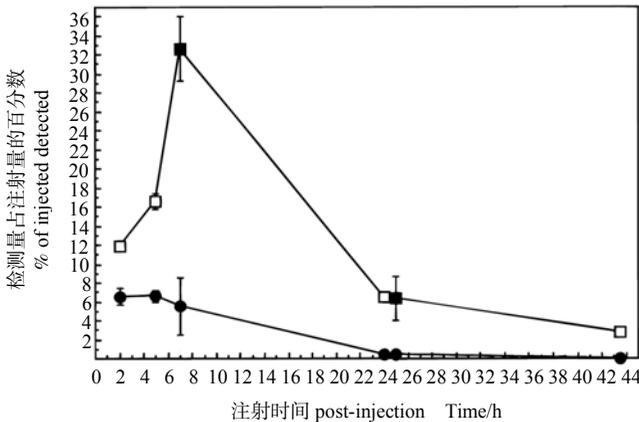


图 3-12 用 PPase 法(●)、Lemieux 氧化-GC/MS 法(■)以及<sup>14</sup>C 放射性同位素标记法(□)测定鲑鱼肝脏中 MC-LR 含量的结果的比较(引自 Williams et al. 1997a)

Fig. 3-12 Summary of the results for the detection of MC-LR in salmon livers by PPase assay (●), Lemieux oxidation-GC/MS(■) and<sup>14</sup>C-radioisotope (□) analyses (Cited from Williams et al. 1997a)

## 四、甲醇可萃取 MC 的测定

### 1. 腹腔注射 MC-LR(鲫鱼)

Malbrouck 等(2003)通过腹腔注射的方式研究了 MC-LR 在鲫鱼幼鱼肝脏中的累积规律。实验所用的鲫鱼体重为 30g, 每天投喂商用干饲料(Aqualife, BIOMAR, France)。腹腔注射 MC-LR 的剂量为 125  $\mu\text{g}/\text{kg}$  BW, 对照组注射等量的 0.8% 的 NaCl。实验期间的水温为(15 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$ 。分别在 0 h、3 h、8 h、24 h、48 h、96 h 取样, 每次取 3 尾鱼的肝脏用于毒素分析。肝脏中的 MC-LR 含量用 PPIA 法测定。对照鱼肝脏中的 MC-LR 含量低于  $5\times 10^{-3}$   $\mu\text{g}/\text{g}$  组织。注射 MC-LR 鱼体中的 MC-LR 含量在 3~8 h 上升, 其后不断下降(图 3-13)。

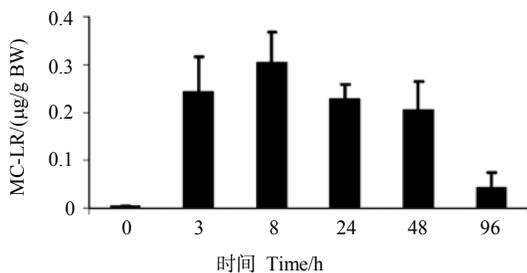


图 3-13 腹腔注射 MC-LR(125  $\mu\text{g}/\text{kg}$  BW)后, 鲫鱼 *Carassius auratus* 幼鱼肝脏中的 MC-LR 浓度的变化, 数据为平均值 $\pm$ SD( $n=5$ ) (引自 Malbrouck et al. 2003)

Fig. 3-13 Changes in the concentration of MC-LR in liver of juvenile goldfish *Carassius auratus* after an i.p. injection of MC-LR (125  $\mu\text{g}/\text{kg}$  BW). Data are represented as mean  $\pm$ SD ( $n=5$ ) (Cited from Malbrouck et al. 2003)

Malbrouck 等(2004a)通过腹腔注射的方式进一步研究了 MC-LR 在饥饿的和摄食的鲫鱼幼鱼肝脏中的累积规律。所用的鲫鱼体重为 30 g, 实验前, 将鲫鱼幼鱼进行两种不同的处理: 一组鱼每天投喂商用干饲料, 而另一组鱼饥饿 7 天, 每组 45 尾幼鱼。在每组鱼中取 20 尾腹腔注射 MC-LR(MC-LR 剂量为 125  $\mu\text{g}/\text{kg}$  BW), 另取 20 尾注射等量的 0.8% 的 NaCl。实验期间, 饥饿组鱼类保持饥饿, 投饵组鱼类保持每天投饵。实验期间的水温为(15 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$ 。分别于 6 h、24 h、48 h 和 96 h 取肝组织样, MC 的含量用 PPIA 法测定。腹腔注射 6~48 h 期间, 两组处理鲫鱼肝脏中的 MC-LR 含量不断上升, 而后显著下降, 其中在注射后 48 h, 饥饿组肝脏中累积的 MC-LR 含量显著高于投饵组(图 3-14), 表明鱼类的摄食状态与 MC-LR 的肝毒性有关。

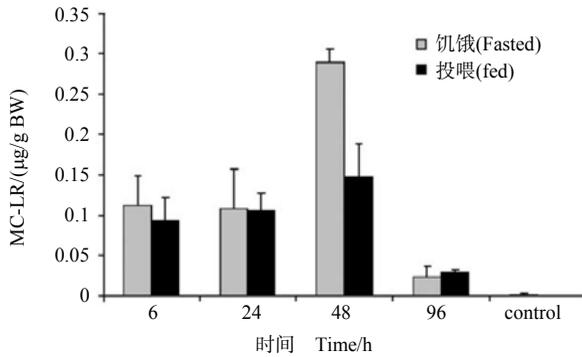


图 3-14 腹腔注射 MC-LR(125 µg/kg BW)后, 鲫鱼 *Carassius auratus* 幼鱼肝脏中的 MC-LR 浓度的变化, 数据为平均值±SD(n=5)(引自 Malbrouck et al. 2004a)

Fig. 3-14 Changes in the concentration of MC-LR in liver of juvenile goldfish *Carassius auratus* after an i.p. injection of MC-LR (125 µg/kg BW). Data are represented as mean±SD (n=5)(Cited from Malbrouck et al. 2004a)

比较两次实验的结果, 在同样的实验条件, 鲫鱼肝脏中 MC-LR 达到峰值的时间出现很大差异, 第一次实验为注射后 8 h, 第二次实验为注射后 48 h。

## 2. 腹腔注射 MC 粗毒素(鳙鱼)

Li 等(2005)从滇池收集的蓝藻藻粉(MC-RR、MC-LR 和 MC-YR 含量分别为 0.84 mg/g DW、0.50 mg/g DW 和 0.07 mg/g DW)中萃取出 MC 粗毒素, 通过腹腔注射的方式研究了 MC 在鳙鱼幼鱼肝脏中的累积规律。所用的鳙鱼体重 (51.3±1.8) g, 腹腔注射 MC(MC-LR+MC-RR)的剂量分别为 400 µg/kg 和 1000 µg/kg BW(称为低剂量和高剂量), 实验期间的水温为(20±1) °C。分别在 1 h、3 h、12 h、24 h、48 h 取样, 每次取 3 尾鱼的肝脏用于毒素分析。肝脏中的 MC 含量用 HPLC 法测定。

由于在低剂量组的 3 h 无数据, 因此无法准确判断 MC 的峰值, 但是估计可能在 12 h 处[图 3-15(A)]。在高剂量组, 3 h 出现峰值, 之后迅速下降[图 3-15(B)]。值得注意的是, 虽然 MC-LR 占所注射 MC 总量的 35.5%, 低剂量组肝脏中仅检测出 MC-RR, 而在高剂量组, 虽然 3 种毒素均被检测出, 但 MC-LR 所占的比例很小。Li 等(2005)认为, 当 MC-LR 进入血液后, 鳙体内可能存在某种活跃地降解或者结合 MC-LR 的机制。从本实验的结果可以看出, 注射剂量还影响肝脏中 MC 峰值出现的时间, 即剂量越大, 峰值出现越早。

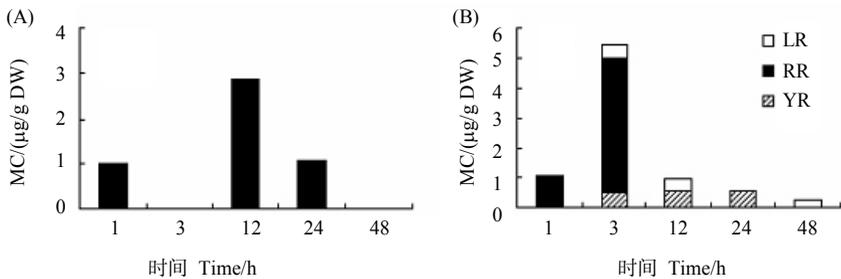


图 3-15 腹腔注射 MC 后，鳙鱼肝脏中的 MC 浓度的变化，(A) 400 µg MC/kg DW，(B) 1000 µg MC/kg DW(引自 Li et al. 2005)

Fig. 3-15 MC concentration in liver of bighead carp after i.p. with microcystins at doses of (A) 400 and (B) 1000 µg MC/kg DW respectively (Cited from Li et al. 2005)

### 3. 灌喂冷冻干燥的有毒铜绿微囊藻藻粉(虹鳟)

Tencalla 和 Dietrich(1997)通过灌喂铜绿微囊藻藻粉的方式，研究了 MC 在虹鳟幼鱼体内的迁移转化规律，还进行了 MC-LR 抑制虹鳟肝脏蛋白磷酸酶活性的体外实验。所用的鱼为虹鳟幼鱼，平均体重 60 g，购自 Thedy Wase 商用鱼类孵化厂(Andelfingen, switzerland)。实验前，将鱼驯化一周，投喂商用虹鳟饲料。实验前 24 h 停止投喂。灌喂前用三卡因(tricaine)将鱼轻度麻醉。冷冻干燥的铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)PCC7806 来自瑞士水资源与水污染联邦研究所(Swiss Federal Institute for Water Resources and Water Pollution)。通过 HPLC 的分析，该藻粉主要含 MC-LR，仅含有少量的其他类型的 MC 或者 MC-LR 的构象异构体(conformational variant)，实验表明，两种毒素均对小白鼠有毒且毒性相当(comparable)，因此合并在一起称为 MC-LR\*。该藻粉的毒素含量为 4.6 µg MC-LR\*/mg 干藻粉。

#### (1) 灌喂实验

将干藻粉溶于脱氯(dechlorinated)水中，用注射器将 1 mL 的藻类悬浮液直接注入虹鳟的胃中，剂量为 5700 µg MC-LR\*/kg BW，而在对照组仅注入 1 mL 的水，然后将鱼放回水族箱，分别于 1 h、3 h、12 h、24 h、48 h 和 72 h 取鱼样，每次取 3 尾对照鱼和 3 尾实验鱼，麻醉致死解剖取肝脏样品用于分析蛋白磷酸酶活性及毒素含量。另取肝脏样品用于组织学和扫描电镜分析，通过心脏穿刺(heart puncture)取血浆(plasma)，直接用 PPIA 法测定 MC 含量；将肝脏制成匀浆，再用甲醇萃取后用 PPIA 法测定 MC 含量。

在 72 h 的实验期间，5700 µg MC-LR\*/kg BW 的剂量未导致虹鳟的死亡。灌喂有毒微囊藻藻粉后，虹鳟肝脏中的蛋白磷酸酶活性几乎立即下降(图 3-16)：1 h 后约为对照组的 60%，3 h 后实际上无法检测出，此后又逐渐恢复，经过 72 h 达到对照组的 50%以上。

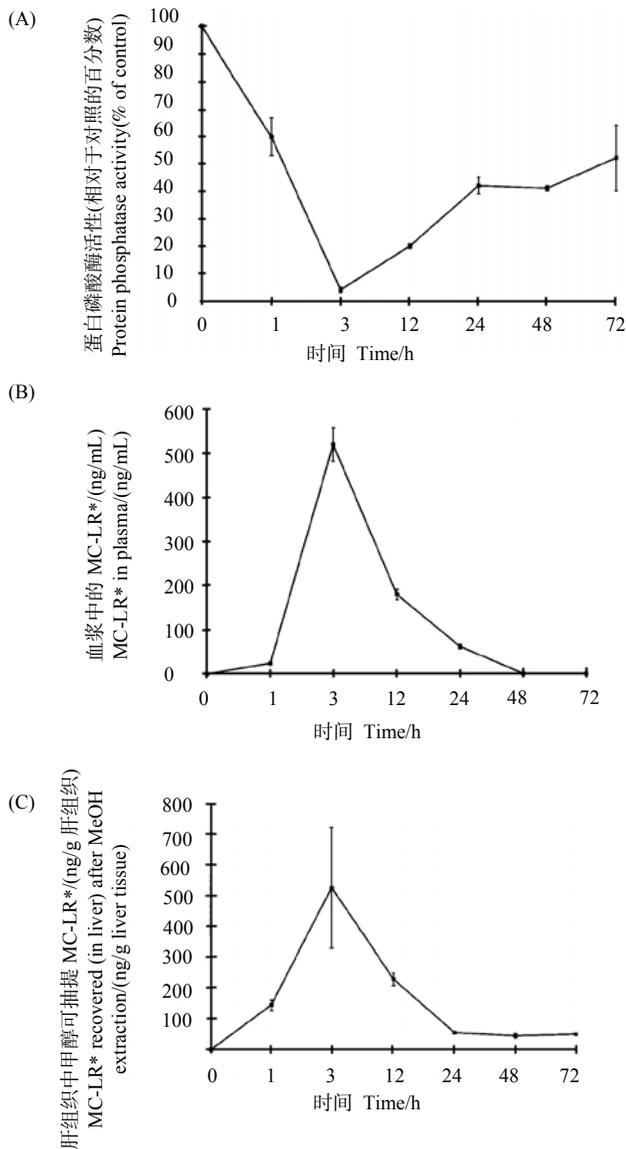


图 3-16 将有毒的 *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 直接注入虹鳟胃(剂量为 5700  $\mu\text{g}$  MC-LR\*/kg BW)后, (A) 虹鳟肝脏中蛋白磷酸酶活性; (B) 血浆中的 MC-LR\* 含量以及(C)肝组织中可萃取 MC-LR\* 的含量的变化。所有的点表示平均值 $\pm$ S.D.(引自 Tencalla and Dietrich 1997)

Fig. 3-16 Hepatic protein phosphatase activities (A) in trout after gavage with toxic *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 at the equivalent dose of 5700  $\mu\text{g}$  MC-LR\*/kg body weight; (B) MC-LR\* concentrations found in plasma; and (C) extractable MC-LR\* concentrations in liver tissue. All points represents averages $\pm$ S.D. (Cited from Tencalla and Dietrich 1997)

1) 血液从肠胃(gastrointestinal tract)中对 MC-LR\*的吸收很快

在 3 h, 血浆中的毒素含量达到最大值(517±38) ng/mL, 然后逐渐下降, 经过 48 h, 降到了检测限以下(图 3-16), 计算得到血浆中的 MC-LR\*的半衰期为 3.3 h。

2) 消化道是 MC-LR\*的重要屏障

通过计算曲线的面积(AUC)得 72 h 内进入到血液中的 MC-LR\*的总量为 6019 ng/mL, 根据实验观察, 虹鳟体内循环的血液量约为体重的 4%, 因此, 进入到血液中的 MC-LR\*的总量约占整个投喂剂量的 4.4%。

3) MC 对肝脏的高亲和性、肝脏对毒素的吸收比清除快

MC 对肝脏具有较高的器官亲和性, 对肝脏的 PP-1 和 PP-2A 具有快速和完全的抑制性。MC-LR\*一旦进入血液便很快进入肝脏: 在肝脏, 1 h 后便可检测到毒素, 在 3 h 达到最大值(524±197) ng/g, 24 h 后迅速降低到(51±5) ng/g, 经过 72 h, 仍然还有(44±5) ng/g, 在快速清除期计算得到半衰期为 6.3 h。通过计算 AUC 得 72 h 内进入到肝脏中的可萃取的 MC-LR\*的总量为 8494 ng/g。根据实验观察, 虹鳟肝脏的总量约为体重的 1%, 因此, 进入到肝脏中的可萃取的 MC-LR\*的总量约占总投喂量的 1.5%。

4) MC 与肝细胞蛋白的共价结合

在填喂 3 h 后, MC 对肝脏的 PP-1 和 PP-2A 的抑制达到最大值。此时, 在肝脏中的毒素约 63%难以通过蛋白磷酸酶抑制法检测出, 因此最有可能是与细胞蛋白形成了共价结合。

5) 胆汁酸运输系统在毒素转送过程中的作用

根据肝脏对毒素的快速吸收及毒素的毒性作用对肝脏有明显的特异性, Tencalla 和 Dietrich(1997)推测, 鱼类可能和哺乳动物一样, 胆汁酸运输系统在将毒素转送到靶器官的过程中扮演着重要的角色(Runnegar et al. 1981, 1991, Eriksson et al. 1990a, Hooser et al. 1991)。

6) 胆汁(bile)在将肝脏中过多的 MC 清除及再循环中的作用

Tencalla 和 Dietrich(1997)认为, 与用大鼠(rat)和小鼠(mouse)进行实验所得的结果(Falconer et al. 1986, Meriluoto et al. 1990, Pace et al. 1991)类似, 胆汁在将鱼类肝脏中过多的 MC 清除及再循环中具有重要作用, 因为: ① 在灌喂了有毒蓝藻的虹鳟的胆囊(gall bladder)中检测到 MC 的存在(Sahin et al. 1996); ② 在腹腔注射了<sup>3</sup>H-MC-LR 的鲑鱼的消化道中也发现有毒素的存在(Williams et al. 1995)。

当鲑鱼被灌喂了有毒蓝藻后, 随着毒素在肝脏中的增加, 肝细胞中的 PP-1 和 PP-2A 的活性不断下降, 肝组织结构发生变化。但是处理 3 h 后, 酶活性开始恢复, 在 72 h 时, 恢复到对照的 50%的水平, 虽然肝组织的损害和坏死(necrotic)仍在继续。Tencalla 和 Dietrich(1997)认为, 因为磷酸酶-MC 的结合是不可逆的(Takai et al. 1995), 所观察到的酶活性的增加可能是由于仍然还起作用的肝脏细胞为了克服功能失调而进行了酶的新的合成。但事实上, 虽然有新的酶合成, 仍然无法阻

止肝损伤的进程。

## (2) MC-LR 抑制虹鳟肝脏蛋白磷酸酶的体外实验

取上述仅灌喂了水的对照虹鳟的肝脏，制成匀浆。将纯 MC-LR(Sigma)溶解在磷酸酶缓冲液(phosphatase buffer)中。在 200  $\mu$ L 肝脏匀浆(相当于 50 mg 肝组织)中加入 100  $\mu$ L 各种浓度的 MC-LR 溶液，经强烈的旋转(vigorously vortexed)后，等分试样用于分析，对照组仅加入不含毒素的缓冲液。

体外实验结果表明，虹鳟肝脏中的 PP-1 和 PP-2A 活性以一种剂量依赖型(dose-dependent)的方式受到纯 MC-LR 的抑制[图 3-17(A)]，导致这两种(混合)酶的活力失去 50%的毒素含量为 600 ng/g 肝组织匀浆，当毒素含量达 2000 ng/g 肝组织匀浆时，酶活力完全丧失。当 100 ng 的 MC-LR 被添加到每克肝组织匀浆中去时，在甲醇萃取物中无法检测到 MC-LR，当添加量超过 100 ng/g 时，MC-LR 的检测量增加，而当添加量超过 2000 ng/g 时，回收率(recovery rate)呈直线增加[图 3-17(B)]。

## 4. 投喂有毒的鲜微囊藻(鲢)

Xie 等(2004)通过投喂的方式，研究了鲢对微囊藻毒素的累积和清除规律。实验用的有毒蓝藻采自日本长野县松本市附近的一池塘(Chikato Pond)，绿色微囊藻(*Microcystis viridis*)占藻类生物量的 90%以上。鲢鱼幼鱼[(10 $\pm$ 6) g]购自 Saitama 渔业公司，实验在两个大塑料桶(容积 1000 L)中进行，各养殖有 40 尾鲢鱼。实验期间的水温为 15.5~25.3  $^{\circ}$ C(平均 20.7  $^{\circ}$ C)。实验共分两个处理(A 和 B)，在 7 月 5 日至 8 月底，处理 A 和 B 均仅投喂绿色微囊藻，每隔 5 天投喂一次，根据鲢在水温 15~25 $^{\circ}$ C 时的日粮(相当于体重的 3%~12%)进行投喂。在 B 处理中，40 天后停止投喂绿色微囊藻，在接下来的 40 天改投不含藻毒素的鲤鱼人工饲料；而在 A 处理中，一直投喂绿色微囊藻。每隔 20 天，分别从两个处理的塑料桶中取 10 尾鱼解剖，取背部肌肉、血液、肝脏、肠道(包括肠壁和肠含物)用于 MC 的分析。9 月 3 日(刚完成第 3 次取样)，由于主要的营养盐含量很高，为防止鱼的伤害，将两个桶中的水(包括微囊藻)全部换掉。桶中的水量随着鱼数量的减少而调整以保持一定的密度。鱼组织、池塘中采集的微囊藻以及实验桶水中的颗粒悬浮物中的 MC 含量用 HPLC 法进行测定。

从池塘中采集的绿色微囊藻的 MC-RR 和 MC-LR 的含量分别为 268~580  $\mu$ g/g DW 及 110-292  $\mu$ g/g DW，在 A 桶的颗粒悬浮物中的 MC-RR 和 MC-LR 的含量分别为 41.5-99.5  $\mu$ g/g DW 及 6.9  $\mu$ g/g DW ~15.8  $\mu$ g/g DW(图 3-18)。血液、肝脏和肌肉中的 MC-RR 的最大值分别为 49.7  $\mu$ g/g DW、17.8  $\mu$ g/g DW 和 1.77  $\mu$ g/g DW；在血液和肌肉样品中未检测到 MC-LR 的存在(在肝脏中也仅有一次被检测出，且量很低)(图 3-19)。虽然未检测胆囊中的 MC 含量，但很明显，MC 对胆囊的影响很大，主要是使胆囊变硬、萎缩、颜色变成暗红和深绿色，而停止投喂有毒蓝藻

40 天后，胆囊基本恢复到正常的形态(图 3-20)。类似地，在云南星云湖，有严重的有毒蓝藻水华发生，于 2003 年 11 月 15 日从该湖中采集的鲢鳙胆囊普遍有不同程度的硬化现象，其中一尾鲢鱼的胆囊硬如石头(图 3-21)。

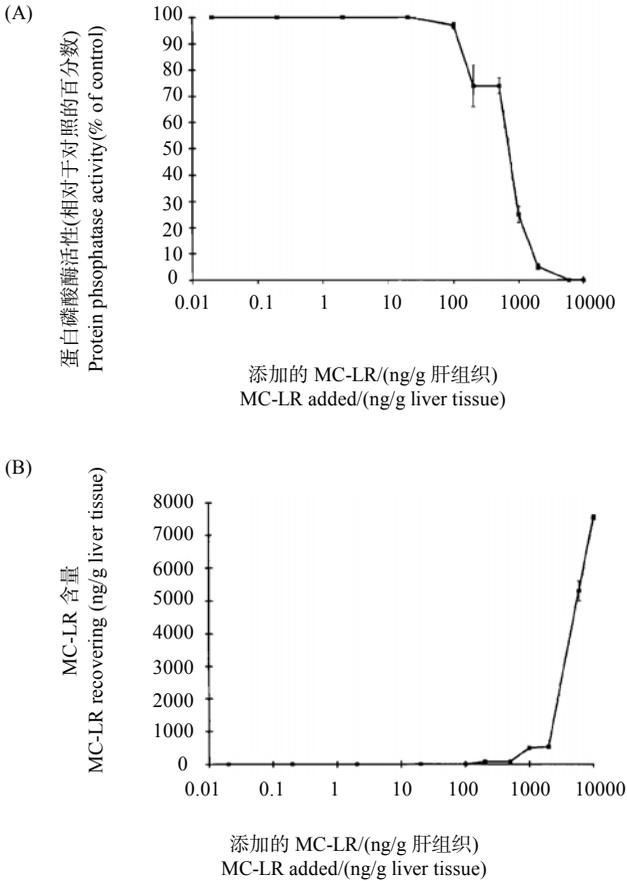


图 3-17 虹鳟肝脏匀浆中 MC-LR 对 PP-1 和 PP-2A 的抑制(A);  
该肝组织的甲醇萃取物中的 MC-LR 含量 (B)  
(引自 Tencalla and Dietrich 1997)

Fig. 3-17 (A) Inhibition of protein phosphatases 1 and 2A contained in trout liver homogenates by pure microcystin-LR; (B) microcystin-LR recovery after methanol extraction of the same liver extracts (Cited from Tencalla and Dietrich 1997)

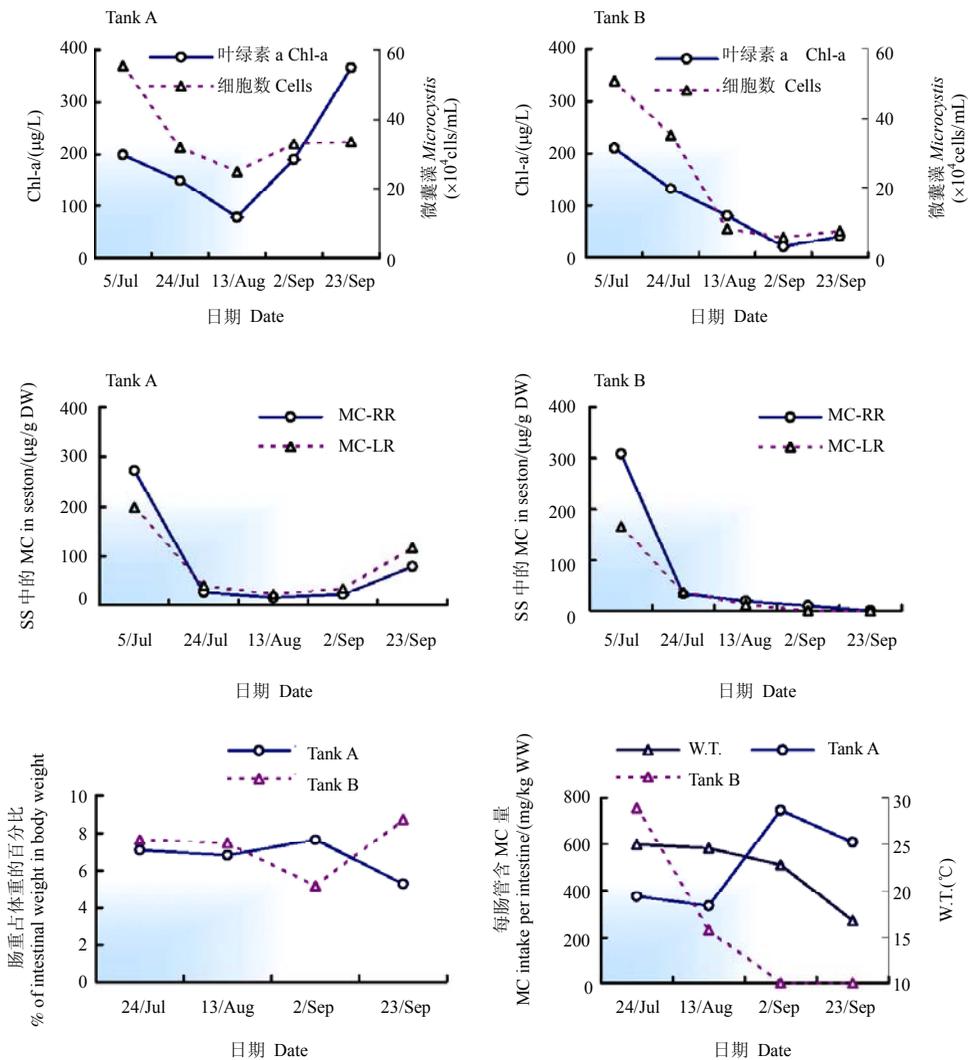


图 3-18 实验桶水中的叶绿素 a(Chl-a)和绿色微囊藻细胞数、颗粒悬浮物(SS)中的 MC-RR 和 MC-LR、肠管占体重的百分含量以及每一肠管所摄入的 MC 含量的动态变化(引自 Xie et al. 2004)

Fig. 3-18 The dynamics of chlorophyll a (Chl-a) and *Microcystis viridis* cells in the water of the tanks, MC-RR and MC-LR in the dry seston (SS), percentage of intestinal weight in body weight, and MC intake per intestinal tract (Cited from Xie et al. 2004)

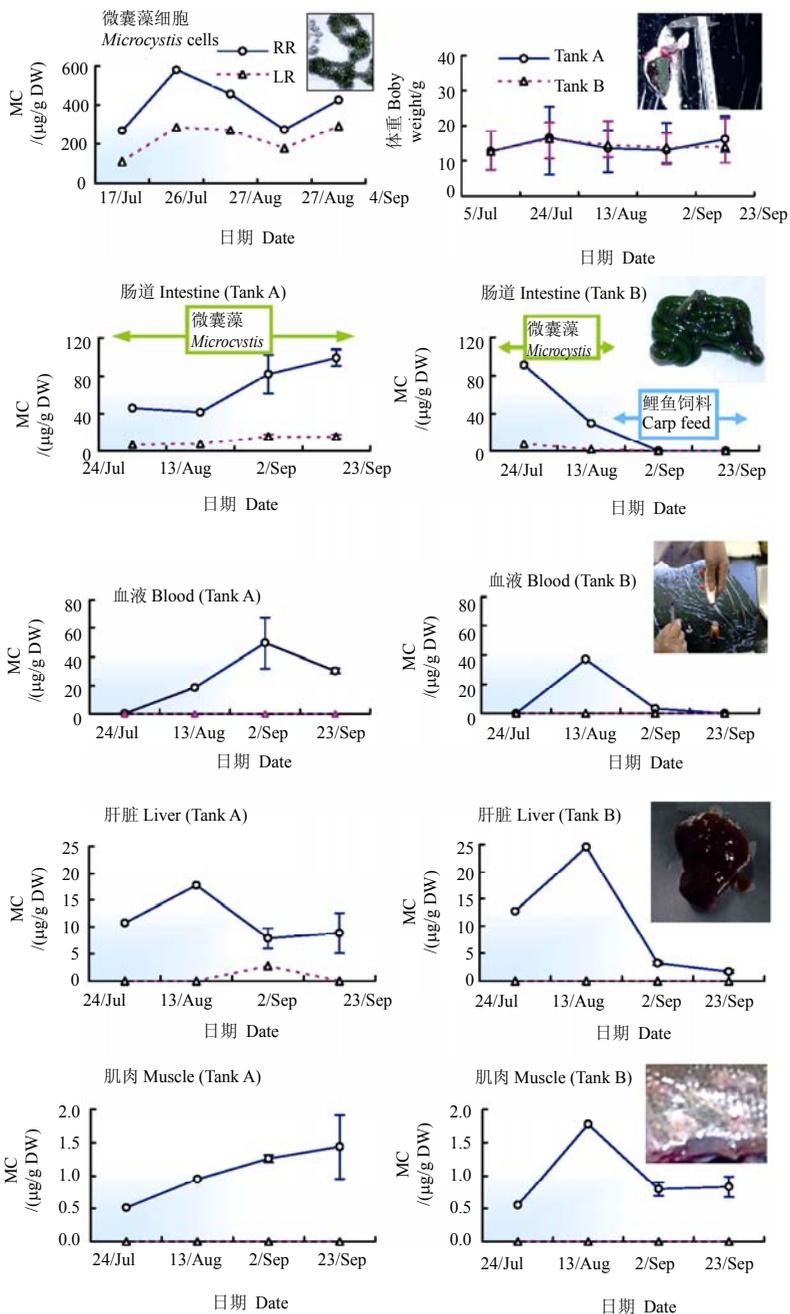


图 3-19 鲢样品体重的变化、所采集的绿色微囊藻细胞以及鲢肠道、血液、肝脏及肌肉中 MC-RR 和 MC-LR 的动态变化(引自 Xie et al. 2004)

Fig. 3-19 The changes in body weight of the sampled silver carp, and the dynamics of MC-RR and MC-LR concentrations in the collected *Microcystis viridis* cells, and in the intestinal tract, blood, liver and muscle of silver carp (Cited from Xie et al. 2004)

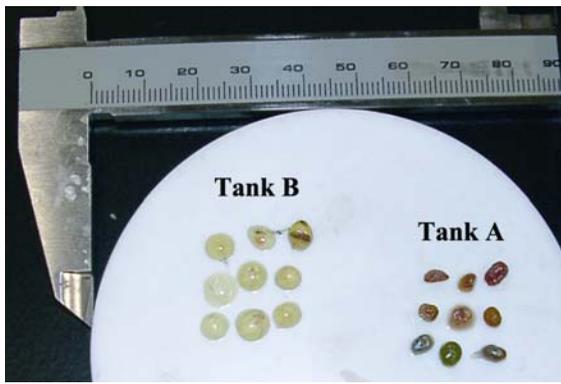


图 3-20 实验结束时(9 月 23 日)两个处理鲢胆囊的形态比较(图片由谢丽强提供)  
 Fig. 3-20 A morphological comparison of the gallbladders of silver carp from fish at the end of the experiment (September 23) (Courtesy Xie L Q)



图 3-21 2003 年 11 月 15 日, 从发生严重有毒蓝藻水华的云南星云湖采集到的鲢鱼胆囊, 硬如石头。该尾鲢体重 300 g(图片由李莉、陈隽和郑利提供)  
 Fig. 3-21 The gallbladder (like a stone) of silver carp collected on November 15, 2003, from Lake Xingyun (in Yunnan) where a heavy toxic cyanobacterial bloom occurred. Body weight of this fish was 300 g (Courtesy Li L, Chen J and Zheng L)

从生理学的角度来说, 血液中未检测到 MC-LR 暗示着很少有 MC-LR 穿过鲢的肠壁内膜进入血液循环。这与对虹鳟进行的灌喂实验的结果完全不同(Tencalla and Dietrich 1997)。在 Xie 等(2004)的实验中, 尽管经过 20 天的摄食, 在鲢的血液中仅检测到少量的 MC-RR, 而已经有相当数量的 MC-RR 在肝脏和肌肉中积累, 这可能说明, 在最初的 20 天, MC-RR 从血液到肝脏的转运非常之快, 以至未能在血液中检测出, 但是, 随着肝脏中 MC-RR 的不断累积及肝脏对 MC-RR 吸收能力的下降, MC-RR 开始在血液中累积。这也许可以解释为何 MC-LR 未能在血液中检测出, 而却有少量在肝脏中存在。但是, MC-RR 和 MC-LR 在鲢体内代谢的

这种巨大差异的生理机制还不清楚。Xie 等(2004)推测：① 在鲢的消化道中，伴随着消化过程，可能存在某种活跃地降解 MC-LR 的机制；② 鲢可能存在某种机制能选择性地阻止 MC-LR 穿过肠壁。据报道，虹鳟的肠道是 MC-LR 的重要屏障：在 3 天内，肝脏和肌肉中累积的 MC-LR 不足投喂剂量的 5%和 1.5%(Tencalla and Dietrich 1997)，而在 24 h 内，肝脏和肌肉中累积的 MC-LR 仅为投喂剂量的 0.28%~1.29%(Bury et al. 1998)。这种对 MC-LR 的屏障功能可能在鲢得到了很大发展。MC-RR 对鱼类的毒性研究极少，尽管鲢的器官中累积了大量的 MC-RR，但并未观察到死亡，表明 MC-RR 对鲢的伤害可能较小。

鲢血液、肝脏和肌肉对 MC-RR 的清除速率慢于吸收速率。鲢对 MC-RR 的清除率依次为血液>肝脏>肌肉，这与急性毒性实验中所观察到的虹鳟肝脏和血液对 MC-LR 的清除规律基本一致(Tencalla and Dietrich 1997)。

从进化的角度来看，鱼类对 MC 的脆弱性可能受到其生活习性及摄食模式的影响(Xie et al. 2004)。贫营养环境的土著鱼类可能比经常暴露在 MC 之中的富营养环境的土著鱼类更加脆弱(Snyder et al. 2002)。Xie 等(2004)认为，食浮游植物鱼类可能比其他食性鱼类对 MC 的抗性更强。

鲢分布于东亚泛洪平原，尤其在肥沃的亚热带长江流域水体中分布广泛，因此，历史上常常生活在含有毒蓝藻的富营养水体(谢平 2003)。鲢形成了主要以浮游植物为食的高效的滤食机制(Xie 1999)，因此，与生活在相对冷水和贫营养环境、以浮游动物和底栖动物为食的虹鳟不同，鲢在进化的过程中发展形成了对 MC 的较强的抗性也不足为奇(Xie et al. 2004)。

鲢对有毒蓝藻的强烈抗性也被在长江中游的亚热带超富营养型湖泊——武汉东湖的研究所佐证。20 世纪 70 年代初至 80 年代中期，东湖每年夏季都有大量的蓝藻水华暴发，优势种类为微囊藻(*Microcystis*)、鱼腥藻(*Anabaena*)和颤藻(*Oscillatoria*) (Xie and Liu 2001)。虽然 1984~1986 年的蓝藻水华对小白鼠有毒(腹腔注射的 LD<sub>50</sub> 为 100~370 mg/kg 干 *M. aeruginosa*)(何家苑等 1990)，而利用 <sup>32</sup>P 对从东湖采集的水华样品(*M. aeruginosa*>90%)的同位素示踪研究表明，鲢对 *M. aeruginosa* 的同化率为 35%~48%(水温 26~30 °C)(朱惠和邓文瑾 1983)。更为重要的是，20 世纪 80 年代中期以后，东湖滤食性鲢、鳙产量的大幅上升彻底地清除了东湖曾大量发生的有毒蓝藻水华(Xie and Liu 2001)。因此，Xie 等(2004)认为，鲢对有毒蓝藻的摄食能力表明可利用食浮游植物鱼类控制富营养水体中的微囊藻毒素污染。

## 5. 投喂由铜绿微囊藻细胞和鱼饲料进行不同组合的混合饵料(红胸罗非鱼)

Soares 等(2004)通过投喂的方式，研究了红胸罗非鱼(*Tilapia rendalli*)幼鱼对微囊藻毒素的累积和清除规律。实验用的有毒蓝藻为铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*) (NPLJ-4)，分离自 Jacarepaguá 泻湖，用 ASM-1 培养基培养。投喂的食物(鱼饲料、有毒微囊藻细胞)均通过添加 2%的琼脂(agar)制成胶质(jelly)状食物。

罗非鱼幼鱼[(5±1) cm]取自一池塘, 该池塘不含有毒蓝藻。实验在装有 60 L 脱氯水(dechlorinated water)的水族箱中进行, 水温保持在(23.5±0.5) °C。实验分成 3 组, 每组使用 3 个水族箱(一个水族箱为对照, 两个水族箱为处理), 每个水族箱放入 20 尾鱼。第一组实验在前 15 天, 对罗非鱼投喂鱼饲料+有毒微囊藻细胞(每天 20.4 μg MC/尾), 而在接下来的 15 天, 仅投喂鱼饲料。第二组实验, 仅对罗非鱼投喂有毒微囊藻细胞(每天 14.6 μg MC/尾), 共持续 28 天。第三组实验, 对罗非鱼投喂鱼饲料+破碎的有毒微囊藻细胞(每天 29.2 μg MC/尾)(模拟衰亡的水华的情形), 共持续 42 天。罗非鱼肝脏、肌肉和粪便中的 MC 含量用 ELISA 法进行测定。

肝脏中最高 MC 含量(2.8 μg/g)出现在仅投喂有毒微囊藻细胞的第二组实验(图 3-23), 在第一组实验中, 肝脏中最高 MC 含量(0.6 μg/g)出现在累积期, 而肌肉中最高 MC 含量(0.05 μg/g)出现在清除期, 而整个清除期的粪便中均能检测到 MC 的存在(图 3-22)。尽管第三组实验比第二组实验 MC 的投喂量要高近 50%, 但与第二组实验中罗非鱼组织中的平均 MC 含量相似(图 3-24), 这表明, 其他饵料的存在可降低鱼类组织中 MC 的累积速率。Amorim 和 Vasconelos(1999)也报道, 在清除期的第 14 天, 仍然能检测到蚌粪便中 MC 的存在。

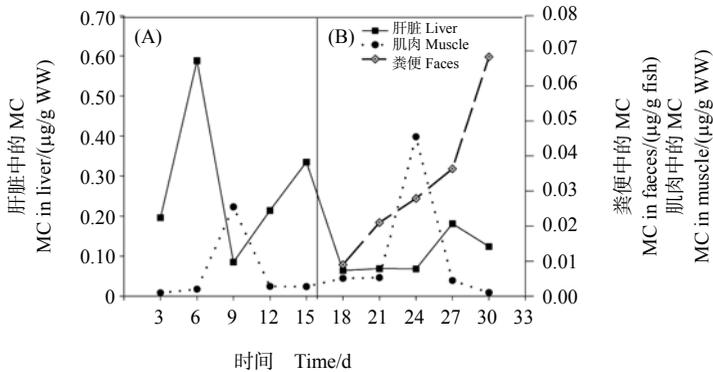


图 3-22 在第一组累积(A)和清除(B)实验中, 红胸罗非鱼肌肉和肝脏中的 MC 含量。在清除阶段, 鱼粪中的 MC 含量也显示在图中。在该实验中, 胶质状食物含商业鱼饲料和有毒铜绿微囊藻细胞 (MC 的投喂量为每天 20.4 μg/尾) (引自 Soares et al. 2004)

Fig. 3-22 MC concentration in liver and muscle of *T. rendalli* during the accumulation (A) and depuration (B) periods in the first experiment. In the depuration period is also presented the MC concentration in faeces. In this experiment the jelly food contained commercial fish food plus toxic *M. aeruginosa* cells [MC offered to fish =20.4 μg/(fish · d)](Cited from Soares et al. 2004)

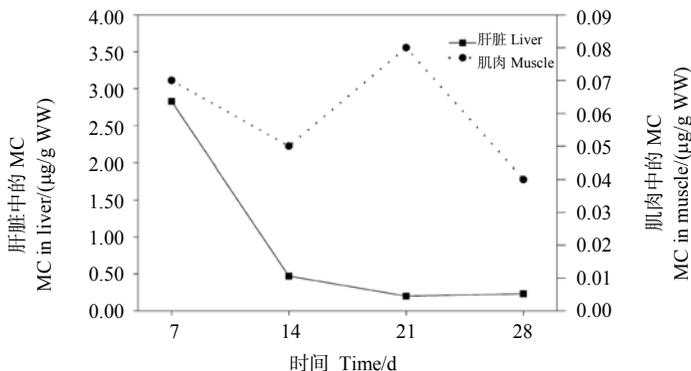


图 3-23 在第二组实验(胶质状食物仅含有毒铜绿微囊藻细胞)中, 红胸罗非鱼肌肉和肝脏中的 MC 含量(MC 的投喂量为每天 14.6 µg/尾)(引自 Soares et al. 2004)

Fig. 3-23 MC concentration in liver and muscle of *T. rendalli* during the second experiment in which the jelly food contained only toxic *M. aeruginosa* cells [MC offered to fish = 14.6 µg/(fish · d)](Cited from Soares et al. 2004)

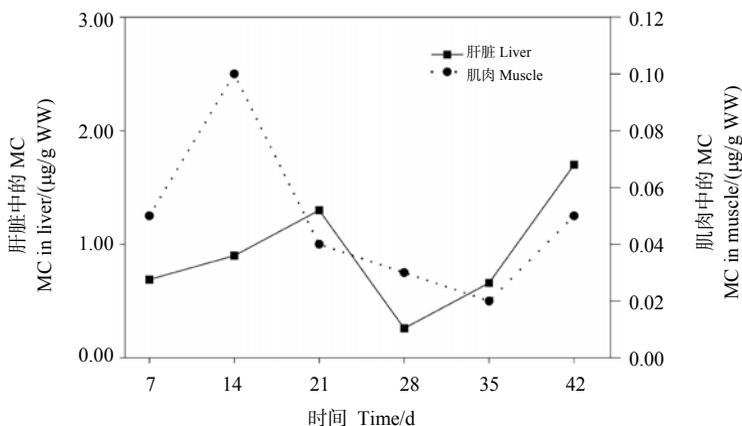


图 3-24 在第三组实验(胶质状食物含商业鱼饲料和破碎的有毒铜绿微囊藻细胞)中, 红胸罗非鱼肌肉和肝脏中的 MC 含量(MC 的投喂量为每天 29.2 µg/尾)(引自 Soares et al. 2004)

Fig. 3-24 MC concentration in liver and muscle of *T. rendalli* during the third experiment in which the jelly food contained commercial food plus lysed toxic *M. aeruginosa* cells [MC offered to fish = 29.2 µg/(fish · d)](Cited from Soares et al. 2004)

## 6. 投喂由微囊藻细胞和鲤鱼干粉饲料制成的混合饵料(鲤鱼)

Li 等(2004)通过投喂的方式, 研究了 MC 在鲤鱼(*Cyprinus carpio*)肝脏中的累积规律。实验用的有毒蓝藻为微囊藻(*Microcystis*), 采自韩国 Naktong 江表面的水华。鲤鱼来自韩国国立渔业研究与发展所的 Jinhae 内陆渔业研究分所, 体重为(322±36) g, 实验在 400 L 的水族箱(共养殖有 10 尾鲤鱼)中进行, 水温保持在(20±1)℃。将水华混

合在商业鲤鱼饲料制成小的黏性颗粒饲料中，每天的投喂量为 50  $\mu\text{g}$  MC/kg 体重，约相当于鲤鱼口服 MC 的  $\text{LD}_{50}$  的 1/10，实验共进行 28 天。实验结束时，取鲤鱼肝脏和肌肉用于毒素分析。毒素含量用 PPIA 法测定。结果表明，肝脏中的 MC-LReq 含量为  $(261.0 \pm 108.3)$  ng/g WW，肌肉中的 MC-LReq 含量为  $(38.3 \pm 12.3)$  ng/g WW。

### 7. 投喂由有毒微囊藻细胞和人工鱼饲料制成的混合饵料(异育银鲫)

Zhao 等(2006)通过投喂不同比例的微囊藻藻粉和人工鱼饲料制成的混合饵料，研究了 MC 在异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)体内各种器官中的累积规律。异育银鲫购自当地的一个孵化厂，微囊藻藻粉来自云南滇池。微囊藻藻粉在混合饲料中的比例分别为 0、15.2%、29.8%、44.7%、59.6%和 74.5%。实验开始前，将异育银鲫在室内适应两周，第 1 周投喂(每天两次)普通鱼饲料，第 2 周投喂等量的混合实验饲料。实验在一个由 30 个玻璃钢圆桶(每个容积 98 L)组成的流水养鱼系统中进行。将 30 个玻璃钢桶随机地分为 6 个处理，每个处理投喂不同的混合饲料，每个玻璃钢桶喂养 40 尾异育银鲫。实验开始时，异育银鲫的体重约为 1.22 g。每天投喂饵料两次，并收集未食饵料和粪便。实验共持续 12 周，实验期间的水温为 18~29℃。实验结束时，取鱼的肌肉、肝脏、胆囊和脾脏，冷冻干燥后用于毒素分析。饵料和鱼组织中的毒素含量用 ELISA 法进行测定。经过 12 周的投喂，随着饵料中 MC 含量的增加，异育银鲫的肌肉、肝脏、胆囊和脾脏中的 MC 含量呈指数函数方式增加(图 3-25,  $R^2=0.89\sim0.97$ ,  $P<0.05$ )，死亡率显著增加，饵料转换效率显著降低，对干物质、蛋白质和能量的表观消化系数(apparent digestibility coefficient)显著下降；MC 含量以肝脏最高，胆囊和脾脏次之，肌肉最低(表 3-4)。

表 3-4 摄取不同饵料的异育银鲫组织中的 MC-LReq 含量(平均值 $\pm$ SE)\*

Table 3-4 MC-LReq content (ng/g) in tissues of gibel carp fed different diets (means $\pm$ SE)\*

饲料 Diet	肌肉 Muscle	肝脏 Liver	脾脏 Spleen	胆囊 Gall bladder
Diet 1	(0.00 $\pm$ 0.00) <sup>a</sup>	(0.00 $\pm$ 0.00) <sup>a</sup>	(0.00 $\pm$ 0.00) <sup>a</sup>	(0.00 $\pm$ 0.00) <sup>a</sup>
Diet 2	(0.019 $\pm$ 0.003) <sup>ab</sup>	(1.69 $\pm$ 0.14) <sup>ab</sup>	(1.47 $\pm$ 0.53) <sup>ab</sup>	(1.79 $\pm$ 0.32) <sup>b</sup>
Diet 3	(0.030 $\pm$ 0.002) <sup>b</sup>	(4.14 $\pm$ 0.36) <sup>bc</sup>	(3.09 $\pm$ 0.22) <sup>b</sup>	(4.14 $\pm$ 0.91) <sup>c</sup>
Diet 4	(0.062 $\pm$ 0.019) <sup>c</sup>	(6.58 $\pm$ 0.67) <sup>c</sup>	(5.32 $\pm$ 0.99) <sup>c</sup>	(3.56 $\pm$ 0.32) <sup>c</sup>
Diet 5	(0.147 $\pm$ 0.035) <sup>d</sup>	(16.81 $\pm$ 1.56) <sup>d</sup>	(7.72 $\pm$ 0.77) <sup>d</sup>	(6.25 $\pm$ 0.20) <sup>d</sup>
Diet 6	(0.171 $\pm$ 0.030) <sup>d</sup>	(40.80 $\pm$ 6.22) <sup>c</sup>	(8.99 $\pm$ 3.02) <sup>d</sup>	(10.56 $\pm$ 0.59) <sup>c</sup>

\*上标不同的平均值有显著差异( $P<0.05$ ) (引自 Zhao et al. 2006)

\*Means with different superscripts are significantly different ( $P<0.05$ ) (Cited from Zhao et al. 2006)

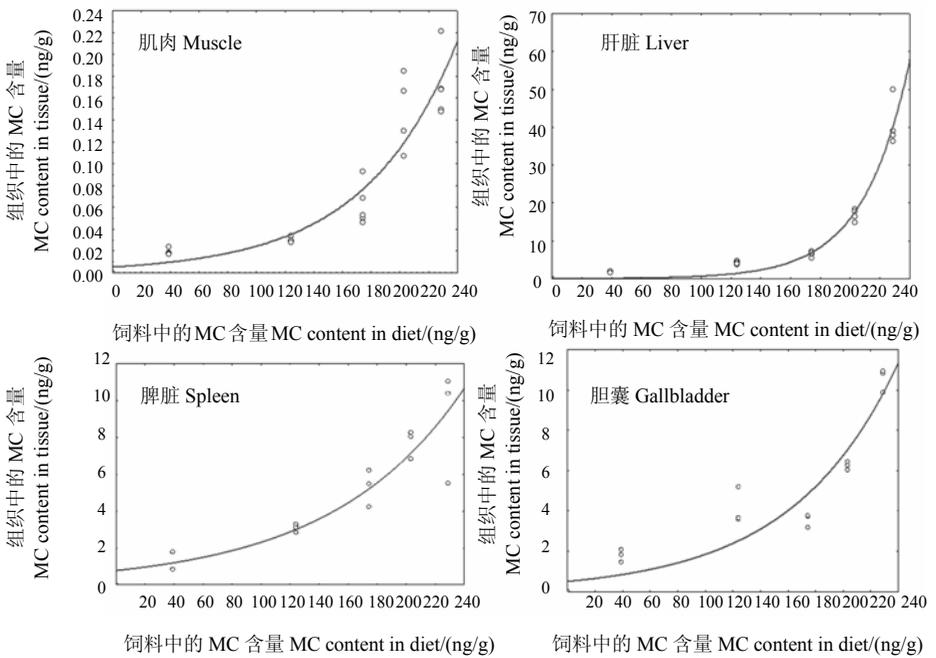


图 3-25 经过投喂 12 周的有毒微囊藻和人工鱼饲料的混合饲料后，异育银鲫肌肉、肝脏、脾脏和胆囊中的 MC 含量与饲料中的 MC 含量的关系(引自 Zhao et al. 2006)

Fig. 3-25 The relationship between MC-LReq content in muscle, liver, spleen and gallbladder of gibel carp and MC content in diets after the carp were fed with a mixture of toxic *Microcystis* cells and artificial fish diet for 12 weeks (Cited from Zhao et al. 2006)

## 8. 天然鱼体内的 MC 在实验条件下的清除规律(尼罗罗非鱼)

Mohamed 和 Hussein(2006)研究了池塘中生长的尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)体内累积的 MC 在实验条件下的清除规律。用于实验的尼罗罗非鱼(大小为 150~200 g)采自埃及 Sohag 市的一鱼池，该鱼池常常被有毒铜绿微囊藻水华所覆盖。水华的主要毒素包括 MC-RR、MC-YR 和 MC-WR，藻浆的毒素含量约为 1.12 mg/g DW。将实验鱼从池塘中捕出后放入一装有池塘水的容器中，运到实验室进行实验。将 30 尾鱼放入一装有脱氯水的容积为 100 L 的水族箱中，水温保持在(25±2) °C，实验持续 96 h。罗非鱼肝脏、胆囊、肠道及实验容器水中的毒素含量分别用 ELISA 和 PPIA 法测定。

两种方法(ELISA 和 PPIA 法)测定的肝脏、胆囊和肠道中的毒素含量无显著差异( $P>0.05$ )(图 3-26 和图 3-27)，而水族箱中的毒素含量用 ELISA 法测定显著高于用 PPIA 法测定的结果(图 3-28)。根据 PPIA 的测定结果，胆囊中的毒素含量显著高于肝脏。类似地，Sahin 等(1996)发现虹鳟胆囊中的 MC 含量为肝脏的好几倍。Mohamed 和 Hussein(2006)认为，在水族箱中，一部分 MC 可能被细菌转换成非环

状(noncyclic)结构,而这种产物不能影响蛋白磷酸酶的活性,但能被 ELISA 辨识,这也就是为何测定水族箱中的毒素含量时,ELISA 法显著高于用 PPIA 法的测定结果。

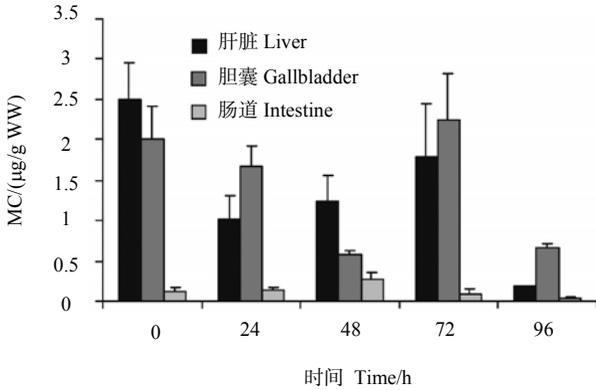


图 3-26 实验期间通过 ELISA 法测得的罗非鱼肝脏、胆囊和肠道中的 MC 浓度的变化(引自 Mohamed and Hussein 2006)

Fig. 3-26 Changes in MC concentrations in livers, gallbladders, and intestines of tilapia fish as determined by ELISA throughout the experimental period (Cited from Mohamed and Hussein 2006)

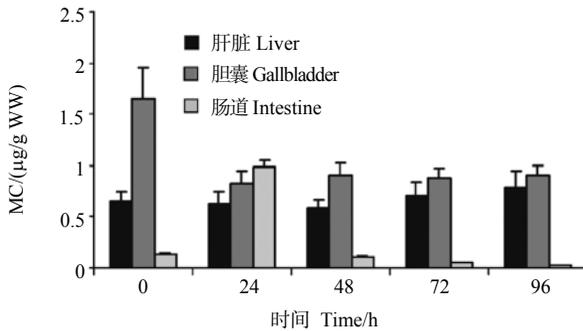


图 3-27 实验期间通过 PPIA 法测得的罗非鱼肝脏、胆囊和肠道中的 MC 浓度的变化 (引自 Mohamed and Hussein 2006)

Fig. 3-27 Changes in MC concentrations in livers, gallbladders, and intestines of tilapia fish (µg/g) as determined by PPIA throughout the experimental period (Cited from Mohamed and Hussein 2006)

需要指出的是,由于在 Mohamed 和 Hussein(2006)的实验中,并未将水族箱中鱼类的排泄物去掉,可能发生鱼类对粪便的再摄食,这也就是为何在他们的实验中即使经过 4 天,肠含物中仍然可检测到 MC 的存在。从这个意义上来说,本实验不能称得上严格的清除实验,因为可能有粪便反复地被摄食。以浮游生物为

食的滤食性鱼类(如鲢、鳙)对自身粪便的摄食已有报道(陈少莲 1990)。

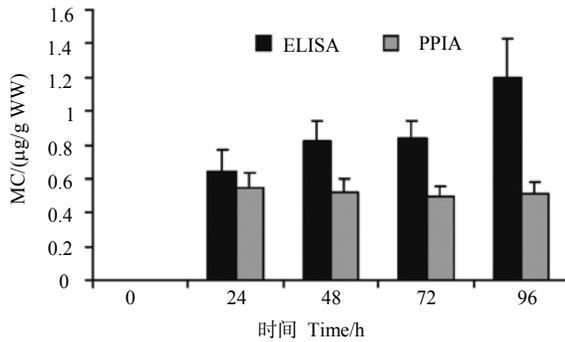


图 3-28 实验期间通过 ELISA 和 PPIA 法测得的自来水中 MC 浓度的变化  
(引自 Mohamed and Hussein 2006)

Fig. 3-28 Changes in MC concentrations in the surrounding tap water ( $\mu\text{g/L}$ ) as determined by ELISA and PPIA throughout the experimental period  
(Cited from Mohamed and Hussein 2006)

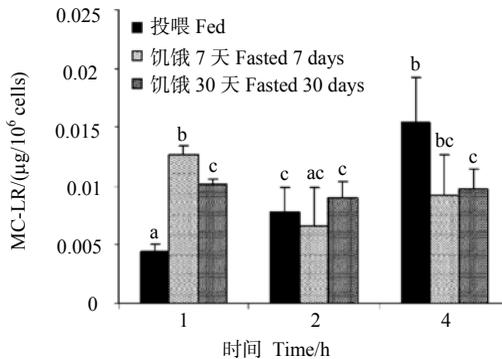


图 3-29 在  $10 \mu\text{g MC-LR/L}$  溶液中浸泡 1 h、2 h 和 4 h 后，鲫鱼幼鱼分离肝细胞中的 MC-LR 浓度。数据为平均值 $\pm$ S.D.( $n=9$ )，至少有一个上标字母相同的两个柱间没有显著差异，而其他在  $P<0.05$  的概率下有差异(引自 Malbrouck et al. 2004b)

Fig. 3-29 Concentration of MC-LR in isolated hepatocytes of juvenile crucian carp *Carassius auratus* after incubation with MC-LR  $10 \mu\text{g/L}$  during 1 h, 2 h and 4 h, respectively. Data are represented as mean $\pm$ S.D. ( $n=9$ ). Bars sharing at least one common superscript are not significantly different, whereas the other comparisons differ at  $P<0.05$  (Cited from Malbrouck et al. 2004b)

## 9. 浸泡于 MC-LR 溶液(从饥饿和投喂处理后的鲫鱼幼鱼体内分离的肝细胞)

Malbrouck 等(2004b)研究了 MC 在饥饿和投喂条件下分离的鲫鱼肝细胞中的累积规律。实验鱼为 30 g 大小的鲫鱼幼鱼。实验前，将鲫鱼幼鱼进行 3 种不同的

处理：每天投饵、饥饿 7 天以及饥饿 30 天，每组 30 尾幼鱼。每种处理分为 3 个重复(将 10 尾鱼的肝脏合并在一起)。分离的肝细胞通过胶原酶(collagenase)处理获得。将分离的肝细胞置于 10  $\mu\text{g}$  MC-LR/L 溶液中，分别于 1 h、2 h、4 h 取样分析肝细胞中的 MC 含量，测定方法为 PPIA 法。

MC-LR 在分离的肝细胞(无论是饥饿还是投喂的)中快速累积，但在饥饿处理的肝细胞中较快，如经过 1 h 的暴露，经过 7 天饥饿处理的肝细胞中的 MC-LR 含量为投喂处理肝细胞的 3 倍(图 3-29)。实验期间，饥饿处理肝细胞中的 MC-LR 在 1 h 即达到最大值，其后十分稳定，而投喂处理肝细胞中的 MC-LR 含量则稳步上升，在 4 h 达到最大值。

## 第四章 自然水体中 MC 在鱼体内的生物累积

在有毒蓝藻出现的水体中, MC 在鱼体内各种器官(组织)中的分布与累积及其季节变化特征, 直接关系到人类的消费安全。对一些淡水水产品在水产品总量中所占比例相对较大且湖泊中有毒蓝藻水华频繁发生的国家(如中国)来说, 水产品的 MC 污染对人类健康的影响不容忽视。虽然这些研究仅测定了用甲醇可萃取的游离态 MC 的含量, 但这对评价消费安全正好具有重要意义。

### 一、巴西 Jacarepagua 潟湖中的红胸罗非鱼体内 MC 含量的季节变化

Magalhães 等(2001)对巴西 Rio de Janeiro 市一浅海岸潟湖(coastal lagoon)—Jacarepagua 潟湖中的红胸罗非鱼(*Tilapia rendalli*)体内的微囊藻毒素的累积情况进行了为期 3 年(1996 年 8 月~1999 年 11 月)的研究。该潟湖面积 3.7 km<sup>2</sup>, 平均水深 1.5 m, 营养水平高, 发生微囊藻(*Microcystis* sp.)水华, 并产生微囊藻毒素。当地居民捕获和食用该潟湖中的红胸罗非鱼。浮游植物的 MC 用甲醇:丁醇:水的混合液(20:5:75, V/V/V)进行萃取。罗非鱼肝脏和内脏(viscera)中的 MC 经甲醇萃取后再用 C<sub>18</sub> 小柱纯化。浮游植物、罗非鱼肝脏和内脏中的 MC 含量用 HPLC 法测定, 而罗非鱼肌肉中的 MC 含量用 ELISA 法测定。浓度为 MC-LR 当量, 罗非鱼重量为湿重。

Magalhães 等(2001)的主要结果如下(图 4-1、图 4-2 和表 4-1):

1) 罗非鱼对 MC 的摄取很快, 因为蓝藻水华发生不久就可在内脏、肝脏和肌肉中检测到毒素。

2) 即使在蓝藻水华下降而在悬浮物中无法检测到 MC 的时期, 仍然可以在肝脏和肌肉中检测出 MC。

3) 当肝脏中的平均 MC 含量达 31.1 μg/g(平均浓度的最大值)时, 肝脏出现异常(abnormal)而充血(hemorrhage), 表现为肝小叶(liver lobe)呈现红点(red spot)小块。然而, 在整个研究期间, 即使悬浮物中 MC 的含量高达 979 μg/L, 也未发现有罗非鱼死亡现象, 罗非鱼可能有解毒系统使毒素代谢为毒性较小的化合物。而 Tencalla 等(1994)向虹鳟幼鱼灌喂冷冻干燥的有毒铜绿微囊藻藻粉(MC 剂量 6.6 μg/g BW)后, 经过 72~96 h, 虹鳟幼鱼全部死亡。

4) 肌肉中的 MC 含量的最大值为 337.3 ng/g(1999 年 9 月), 相当于人日摄取量为 1.68 μg/kg 或超过可忍耐的日摄取量(tolerable daily intake, TDI)的 42 倍。

(5) 食用罗非鱼的鱼肉是危险的，因为在整个研究期间，71.7%的肌肉样品超过日允许摄入量 TDI(0.04  $\mu\text{g}/\text{kg BW}$ )。

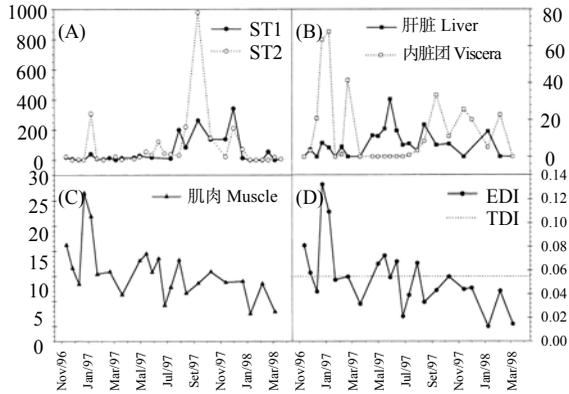


图 4-1 1996 年 11 月至 1998 年 5 月期间，(A) 采样点 1 和 2 的颗粒悬浮物( $\mu\text{g}/\text{L}$ )；(B) 鱼内脏团和肝脏( $\mu\text{g}/\text{g}$ )和(C) 肌肉( $\text{ng}/\text{g}$ )中 MC 含量以及(D) EDI(估算的日摄入量  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )的季节变化。TDI(日允许摄入量)= 0.04  $\mu\text{g}/\text{kg}$ (引自 Magalhães et al. 2001)

Fig. 4-1 Seasonal changes in MC concentration in: (A) seston of sample sites 1 and 2 ( $\mu\text{g}/\text{L}$ ); (B) fish viscera and liver ( $\mu\text{g}/\text{g}$ ); (C) muscle ( $\text{ng}/\text{g}$ ) and (D) EDI (estimated daily intake,  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) from November 1996 to March 1998. TDI (tolerable daily intake) = 0.04  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Cited from Magalhães et al. 2001)

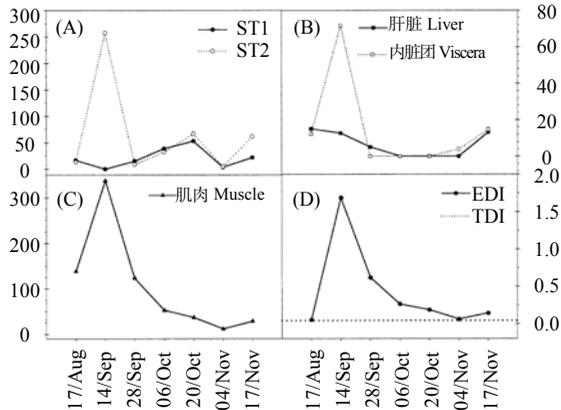


图 4-2 1999 年 8 月至 11 月期间，(A)采样点 1 和 2( $\mu\text{g}/\text{L}$ )的颗粒悬浮物；(B)鱼内脏团和肝脏 ( $\mu\text{g}/\text{g}$ )和(C)肌肉( $\text{ng}/\text{g}$ )中 MC 含量；(D) EDI[ $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ ]的季节变化。

TDI=0.04  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  (引自 Magalhães et al. 2001)

Fig. 4-2 Seasonal changes in microcystins concentration in: (A) seston of sample sites 1 and 2 ( $\mu\text{g}/\text{L}$ ); (B) fish viscera and liver ( $\mu\text{g}/\text{g}$ ); (C) muscle ( $\text{ng}/\text{g}$ ) and (D) EDI estimated daily intake,  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  from August to November 1999.

TDI = 0.04  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  (Cited from Magalhães et al. 2001)

表 4-1 颗粒悬浮物、红胸罗非鱼的内脏团、肝脏和肌肉中的 MC 含量

Table 4-1 MC concentrations in seston, viscera, liver and muscle of Redbreast tilapia

日期 Date	颗粒悬浮物 Seston/( $\mu\text{g/L}$ )	内脏团 Viscera/( $\mu\text{g/g WW}$ )	肝脏 Liver/( $\mu\text{g/g WW}$ )	肌肉 Muscle/( $\text{ng/g WW}$ )
1996 年 8~10 月	0~1.7	0	0	0
1996 年 11 月~1998 年 3 月	0~980.0	0~67.8 (13.4)	0~31.1 (6.3)	2.9~26.4 (10.7)
1998 年 4 月~12 月初	0~1.61	0	0	ca. 2~6
1998 年 12 月末~1999 年 5 月	0~48.8 (17)	0	ca. 0~14	2.4~81.8 (29.9)
1999 年 6 月~8 月初	0~17.1 (4.7)	ca. 0~69	ca. 0~1	9.7~42.9 (27.5)
1999 年 8 月底~11 月	0~257 (46)	0~71.6 (14.6)	0~15 (6.5)	?~337.3

(引自 Magalhães et al. 2001)(Cited from Magalhães et al. 2001)

## 二、巴西 Sepetiba 湾中鱼、蟹和虾体内 MC 含量的季节变化

Magalhães 等(2003)于 1999 年 1~11 月对位于巴西里约热内卢市的 Sepetiba 湾中的鱼、蟹和虾体内的毒素含量的季节变化进行了研究。该海湾(面积  $510 \text{ km}^2$ )半封闭,用于旅游和渔业。取动物肌肉,先经甲醇萃取后,再用  $\text{C}_{18}$  小柱纯化,MC 含量用 ELISA 法测定,浓度为 MC-LR 当量,动物组织重量为湿重。

悬浮物中 MC 含量(图 4-3)与鱼类肌肉中 MC 含量(图 4-4)存在显著的相关性( $r=0.96, P<0.05$ ),这说明了毒素从蓝藻(可能是超微蓝藻)到鱼(通过摄食)的直接转移。动物体内的 MC 含量的最大值出现在蟹体内(1 月份)。Magalhães 等(2003)认为,MC 既可以通过细菌降解,也可以通过黏土(clay)从水中移出(MC 可能被沉积颗粒物吸附),而蟹一旦开始摄食碎屑(detritivorous),便可能因为摄食这些含 MC 的颗粒物而被毒素污染。由于 25% 的鱼肉和蟹肉中的 MC 含量超过了世界卫生组织(WHO)制定的 TDI 标准[ $0.04 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ ],因此,需要严格监测 Sepetiba 湾的渔产品中的 MC 含量,防止出现人类的中毒事件。

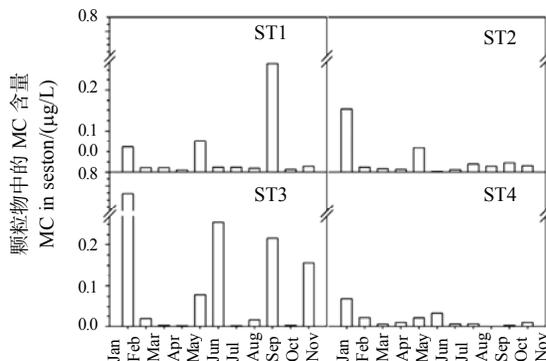


图 4-3 Sepetiba 湾 4 个采样站颗粒悬浮物中的 MC 含量(引自 Magalhães et al. 2003)

Fig. 4-3 MC concentration in seston samples of four sampling stations in Sepetiba Bay (Cited from Magalhães et al. 2003)

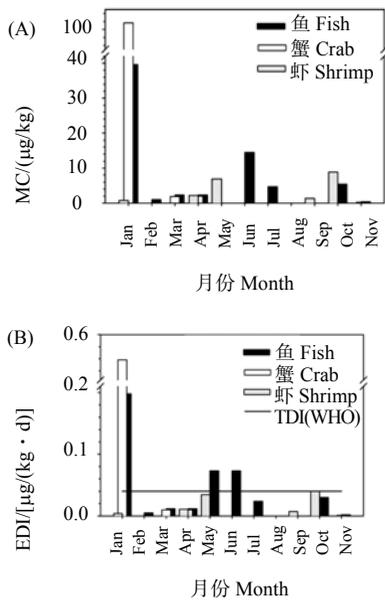


图 4-4 (A) 从 Sepetiba 湾采集的鱼肌肉、虾和蟹体内的 MC 含量；  
 (B) 根据所分析动物体内的含量所估计的每天摄取的 MC 量(TDI)的变化 (引自 Magalhães et al. 2003)

横线表示 WHO 确定的每天允许总摄入量

Fig. 4-4 (A) MC concentration in fish muscles, shrimp and crab collected in Sepetiba Bay;  
 (B) Variation of the esteemed values of daily consumption of microcystin (TDI) starting from the concentration observed in the analyzed animals (Cited from Magalhães et al. 2003)

The line represents the allowed daily total ingestion, established by WHO

### 三、埃及鱼池中尼罗罗非鱼体内的 MC 含量

Mohamed 等(2003)于 2000 年 6 月研究了埃及一鱼池中的尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)鱼体内的 MC 的含量。该鱼池面积为 8750 m<sup>2</sup>, 位于 Sohag 市东南 15 km<sup>2</sup> 处。鱼池附近有一个餐厅, 销售以该池塘中的鱼为原料做成的油炸(fried)鱼和熏(smoked)鱼。在每年的温暖季节(4~12 月), 鱼池中都会发生严重的铜绿微囊藻水华。从该鱼池中采集的藻浆和鱼体各器官(肠、肝脏、肾脏和肌肉)中的 MC 经用甲醇萃取和 C<sub>18</sub> 小柱纯化后, 用酶联免疫法(ELISA)法测定。将鱼按肠道中微囊藻细胞的数量多少分为 3 组: 第 1 组细胞数较少(5×10<sup>6</sup>~10×10<sup>6</sup>), 第 2 组细胞数中等(10×10<sup>6</sup>~15×10<sup>6</sup>), 第 3 组细胞数最多(>15×10<sup>6</sup>)。该池塘中的藻类生物量达 6.7 g DW/L, MC 的含量为 1.12 mg/g DW。MC 含量的最高值出现在肠道(821 ng/g WW), 其次为肝脏(531.8 ng/g)和肾脏(400 ng/g), 而肌肉中的含量最低(102 ng/g)(图 4-5)。鱼的肾脏和肌肉中的 MC 含量与肝脏有很好的相关性( $r=0.92$  和  $r=0.96$ ), 此外,

肝脏重量与体重之比与肝脏中的毒素含量呈正相关性( $r=0.74$ ),表明 MC 导致了罗非鱼的肝脏肿大。

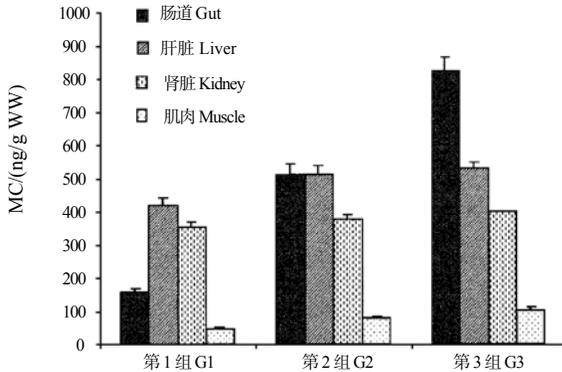


图 4-5 从 EI-Dowyrat 渔场采集的尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)肠道、肝脏、肾脏和肌肉的甲醇抽提物中的 MC 含量(ng/g 鲜重) (引自 Mohamed et al. 2003)

Fig. 4-5 MC concentrations (ng/g fresh weight) in methanol extracts of gut, liver, kidney and muscle tissue of the freshwater fish *Oreochromis niloticus* collected from EI-Dowyrat fish farm (Cited from Mohamed et al. 2003)

Mohamed 等(2003)认为, MC 在鱼体内的累积即使不对鱼产生毒害作用,也可能超过建议的 MC 的安全摄入水平。假定成人的平均体重为 60 kg,按肌肉中的含量为 100 ng/g 来计算,如果平均每人每天消费 100~200 g 鱼,就相当于摄入了 10~20  $\mu\text{g}$  的 MC,这大概是世界卫生组织对 MC-LR 的临时性的 TDI 值[0.04  $\mu\text{g}/(\text{kg BW} \cdot \text{d})$  ]的 4~8 倍。而 MC 具有热稳定性,高温烹调都很难将其破坏(Harada et al. 1996a),因此,食用该鱼池中的罗非鱼的鱼肉对人的健康是有害的。

值得指出的是,在 Mohamed 等(2003)的研究中,将鱼按肠道中微囊藻细胞的相对数量多少分为 3 组,试图分析肠道中的 MC 与其他器官中的 MC 含量的关系,但是需要考虑以下因素的影响:鱼体内的 MC 含量有一个历史的累积过程,并不是由一次摄食过程所决定;某次摄食少的个体并不意味着每次都如此;采集样品时,食物的消化程度可能存在差异。

#### 四、葡萄牙淡水水体中鱼体内的 MC 含量

Vasconcelos(1999)报道了葡萄牙南部 Guadiana 河中鱼类可食部分(肌肉)中的 MC 含量(测定方法为 ELISA 法)(表 4-2),含量并不是很高,但是种间及种内的变异较大。

表 4-2 葡萄牙淡水水体中不同鱼类可食部分中 MC 含量的最大值和最小值

Table 4-2 Maximum and minimum values of MC in edible parts of different fish species collected in Portuguese freshwaters

种类 Species	MC-LR/(ng/g)
鲤鱼 Carp ( <i>Cyprinus</i> sp.)	50~280
小鲤鱼 Barbel ( <i>Barbus</i> sp.)	0.7~120
乌头 Grey mullet ( <i>Lisa</i> sp.)	8.5~110

(引自 Vasconcelos 1999) (Cited from Vasconcelos 1999)

## 五、中国巢湖不同营养级鱼体内的 MC 含量

Xie 等(2005)研究了我国大型浅水富营养湖泊——巢湖不同鱼类对 MC 的累积规律。巢湖每年夏季都有大量有毒蓝藻水华暴发, 优势蓝藻为微囊藻(*Microcystis*)和鱼腥藻(*Anabaena*)。鱼类样品于 2003 年 9 月采自忠庙附近, 共采集到 8 种鱼类(表 4-3)。将采集到的鱼类解剖, 收集肠道(包括肠含物)、肌肉、肝脏、血液、肾脏和胆囊, 冷冻干燥后用于毒素分析。鱼组织中的 MC 含量用 HPLC 法测定, 并用 LC-MS 进行定性分析。

巢湖蓝藻水华中的 MC 含量为 240  $\mu\text{g/g}$  DW。将 8 种鱼类各器官中的 MC 含量平均, 肠道和血液中的含量最高(MC-RR + MC-LR 分别为 22.0  $\mu\text{g/g}$  和 14.5  $\mu\text{g/g}$  DW), 肝脏、胆囊和肾脏次之(分别为 7.77、6.32 和 5.81  $\mu\text{g/g}$  DW), 肌肉中的含量最低(1.81  $\mu\text{g/g}$  DW)。肌肉中的 MC 含量在杂食性鱼类(鲫鱼 3.26  $\mu\text{g/g}$  DW)和肉食性鱼类(翘嘴鲌 2.22  $\mu\text{g/g}$  DW)中最高, 在浮游植物食性鱼类(鲢 1.65  $\mu\text{g/g}$  DW)和植食性鱼类(鳊 0.660  $\mu\text{g/g}$  DW)中最低, 虽然鲢肠含物中的 MC 含量(137  $\mu\text{g/g}$  DW)比其他鱼类(<6.50  $\mu\text{g/g}$  DW)高出 20 多倍(图 4-6)。肝脏中的 MC 含量也是肉食性鱼类>杂食性鱼类>浮游植物食性鱼类和植食性鱼类。而在肠含物中却呈现出相反的趋势: 浮游植物食性鱼类>杂食性鱼类>肉食性鱼类。Xie 等(2005)列举了 4 种可能的原因: ①肉食性鱼类可能累积了更多的 MC; ②浮游植物食性鱼类可能更活跃地降解 MC; ③肉食性鱼类可能通过消化道以外的途径(如鳃)吸收了 MC; ④上述因素的综合作用。

在 Xie 等(2005)的研究中, 鳊的肠道中未检测出 MC(肠道中充满了水生高等植物), 但鳊的肝脏、肌肉、胆囊和血液中也累积了相当数量的 MC; 类似地, 肌肉中最高的 MC-RR 含量也出现在肉食性鱼类翘嘴鲌, 尽管其肠道中未检测到 MC, 因此, 对像鳊和翘嘴鲌这样的鱼类, 消化道以外的途径可能对 MC 的摄取十分重要。

表 4-3 从巢湖采集到的鱼类的学名、体重、全长、体长、摄食类型和主要食物。有关这些鱼类摄食类型和主要食物的资料引自湖北省水生生物研究所鱼类研究室(1976)

Table 4-3 The scientific name, body weight, total length, body length, feeding type, and main foods of the collected fishes from Lake Chaohu. Information on feeding type and main foods of these fishes are from Ichthyology Laboratory of Institute of Hydrobiology of Hubei Province (1976)

鱼名 Fish name	样品数 No. of sample	体重 BW /g	全长 TL /cm	体长 BL /cm	摄食类型及主要食物 Feeding type, and main foods
<b>鲤科 Cyprinidae</b>					
鲢 <i>Hypophthalmichthys molitrix</i> (Hm)(Hypophthalmichthyinae)	Hm-1	29001500	61.4	58.8	浮游生物食性, 摄食浮游植物和浮游动物
	Hm-2		42.7	34.5	Planktivorous, feeding on algae and zooplankton
鳊 <i>Parabramis pekinensis</i> (Pp)	Pp-1	470	33.4	26.3	植食性, 以水生高等植物为食
(Abramidinae)	Pp-2	100	21.8	17.2	Herbivorous, feeding on macrophytes
鲫鱼 <i>Carassius auratus</i> (Ca)	Ca-1	88.1	17.0	13.5	杂食性, 以附着藻类、碎屑、底栖硅藻和丝状藻类为食
(Cyprininae)	Ca-2	64.2	16.9	12.9	Omnivorous, feeding on attached algae, detritus, benthic diatoms and filamentous algae
鲤鱼 <i>Cyprinus carpio</i> (Cc)	Cc-1	725	36.8	21.9	杂食性, 摄食底栖动物、有机碎屑甚至藻类
(Cyprininae)	Cc-2	625	35.3	29.1	Omnivorous, feeding on zoobenthos, organic detritus and even algae
红鳍原鲌 <i>Culter erythropterus</i> (Ce)	Ce-1	120	22.0	18.0	肉食性, 幼鱼摄食枝角类、桡足类和水生昆虫, 成鱼主要摄食小鱼
(Abramidinae)	Ce-2	105	24.0	19.0	Carnivorous with juvenile fish feeding on Cladocera, Copepoda and aquatic insects and adult fish feeding mainly on small fish
翘嘴鲌 <i>Culter ilishaeformis</i> (Ci)	Ci-1	650	—	—	肉食性, 幼鱼摄食水生昆虫、枝角类和桡足类, 成鱼主要摄食鱼类
(Abramidinae)					Carnivorous with juvenile fish feeding on aquatic insects Cladocera and Copepoda and adult fish feeding mainly on fish
<b>鲮科 Bagridae</b>					
黄颡鱼 <i>Pseudobagrus fulvidraco</i> (Pf)	Pf-1	74.6	19.8	16.4	肉食性, 体长 5~8 cm 的个体摄食浮游动物和水生昆虫, 体长>8 cm 的个体摄食软体动物和小鱼
					Carnivorous with 5~8 cm fish feeding on zooplankton and aquatic insect, and >8 cm fish feeding on molluscs and small fish
<b>鲱科 Clupeidae</b>					
长颌鲚(刀鲚) <i>Coilia ectenes</i> (Co)	Co-1	18	—	—	肉食性, 幼鱼摄食端足类、枝角类和桡足类, 成鱼摄食小鱼和虾
					Carnivorous with juvenile fish feeding on Amphipoda, Cladocera and Copepoda and adult fish feeding on small fish and shrimps

(引自 Xie et al. 2005) (Cited from Xie et al. 2005)

Sahin 等(1996)进行了一个室内的毒性实验, 每千克体重用铜绿微囊藻藻粉 1220 mg(相当于 5.6 mg MC-LR /kg BW)对虹鳟灌喂, 经过 3 h 和 48 h, 胆囊中的毒素 MC-LR 含量(用 PPIA 法测定)分别达 3.50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 0.48  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 假定胆囊的水分含量为 90%, 则胆囊中的毒素 MC-LR 含量为 35.0 $\mu\text{g}/\text{g}$  和 4.75  $\mu\text{g}/\text{g}$ , 灌喂微囊藻后, 胆囊中的毒素在 1 h 即可检测出, 且经过 3 天还可检测出。在 Xie 等(2005)的研究中, 胆囊中的 MC 含量为 0~22.6  $\mu\text{g}/\text{g}$  (平均 6.32  $\mu\text{g}/\text{g}$ ), 这接近 Sahin 等(1996)的实验中的水平。由于 Tencalla 等(1994)报道, 当用 6.6 mg MC/kg BW 灌喂时, 虹鳟在 96 h 内死亡, 当胆囊中的毒素 MC 含量达 22.6  $\mu\text{g}/\text{g}$  时, 这可能表明巢湖鱼体内的 MC 含量接近亚致死或致死水平。

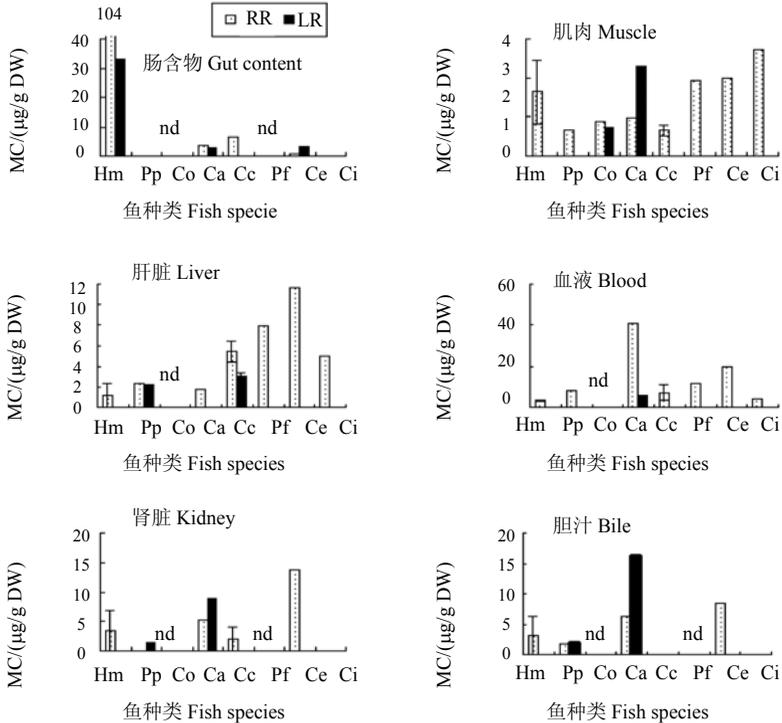


图 4-6 各种鱼类器官中的 MC 含量(引自 Xie et al. 2005)

Hm: 鲢; Pp: 鳊, Cc: 鲤, Ca: 鲫鱼, Ci: 翘嘴鲌, Ce: 红鳍原鲌, Pf: 黄颡鱼, Co: 长颌鲢。nd 表示无数据

Fig. 4-6 MC content in organs of each fish species (Cited from Xie et al. 2005)

Hm: Hypophthalmichthys molitrix, Pp: Parabramis pekinensis, Cc: Cyprinus carpio, Ca: Carassius auratus, Ci: Culter ilishaeformis, Ce: Culter erythropterus, Pf: Pseudobagrus fulvidraco, Co: Coilia ectenes. nd indicates no data

Xie 等(2005)的研究表明, 在巢湖, MC 有沿食物链累积的趋势, 即食物链顶端的肉食性鱼类暴露于 MC 的风险最大。每 100 g 鱼肌肉含 2.64~49.7  $\mu\text{g}$  MC-LReq, 即超过 WHO 对 MC-LR 规定的临时性 TDI 值的 1.3~25 倍。

## 六、荷兰 IJsselmeer 湖中不同食性鱼类肝脏中的 MC 含量

Ibelings 等(2005)研究了荷兰 IJsselmeer 湖 3 种不同营养级鱼类肝脏中的 MC 含量。IJsselmeer 湖是荷兰的一大型浅水湖泊, 20 世纪 30 年代以来就开始出现蓝藻水华, 在大多数年份, *Microcystis* 为形成水华的主要种类。该湖中胡瓜鱼(*Osmerus eperlanus*)为最优势的浮游生物食性鱼类, 欧洲鲈(*Gymnocephalus cernua*)为主要的底栖生物食性鱼类, 而河鲈(*Perca fluviatilis*)是主要的凶猛性鱼类之一。1999 年夏季的 6 月、7 月和 9 月, 从不同的湖区(南部、中部和北部)采集鱼类(胡瓜鱼、欧洲鲈和河鲈各 25 尾), 取 3 种鱼的肝脏样品冷冻干燥、粉碎及萃取后, 用 HPLC 测定 MC 的含量。在上述 3 种鱼类的肝脏中都发现有 MC 的存在, 含量在 9~874  $\mu\text{g/g}$  AFDW(AFDW 为无灰干重, ash-free dry weight), 不同月份所采集的鱼肝脏中的 MC 含量无显著差异( $F=0.508, P>0.05$ ), 胡瓜鱼(浮游生物食性)肝脏中的 MC 含量高于欧洲鲈(底栖生物食性)或河鲈(凶猛性)( $F=20.17, P<0.05$ )(图 4-7)。

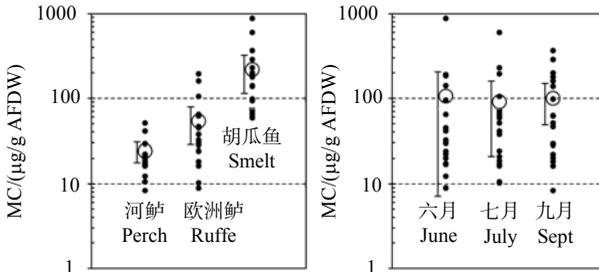


图 4-7 在 IJsselmeer 湖蓝藻水华生长季节的 3 个不同月份中捕获到的 3 种鱼类(河鲈、欧洲鲈、胡瓜鱼)肝脏中的 MC 含量, 所显示的是个体含量以及平均值 $\pm 95\%$ 置信度(引自 Ibelings et al. 2005)

Fig. 4-7 MC content of fish livers for three species (perch, ruffe, and smelt), caught at three months of the cyanobacterial growing season. Shown are individual contents and the average  $\pm 95\%$  confident limits (Cited from Ibelings et al. 2005)

很显然, Ibelings 等(2005)的研究结果与 Xie 等(2005)在我国巢湖的研究结果(无论是肝脏还是肌肉中的 MC 含量都是肉食性鱼类>杂食性鱼类>浮游植物食性鱼类和植食性鱼类)呈现出相反的趋势。需要指出的是, 荷兰 IJsselmeer 湖中鱼类肝脏中的 MC 含量(9~874  $\mu\text{g/g}$  AFDW)远高于巢湖鱼类肝脏中的 MC 含量(1.16~11.6  $\mu\text{g/g}$  DW)。

## 七、自然水体中鱼体内最大 MC 含量的比较

不同水体中采集到的鱼体内的 MC 含量的最大值变化很大(表 4-4), 其中肝脏

中MC含量以IJsselmeer湖中的胡瓜鱼最高(874  $\mu\text{g/g}$  AFDW)(在该研究中未测定其他器官的毒素含量),血液、胆汁、肾脏和肌肉中的MC含量均是以巢湖中的鲫鱼最高(分别为46.43、22.61、14.16和3.26  $\mu\text{g/g}$  DW),而肠道中的MC含量以巢湖中的鲢最高(137  $\mu\text{g/g}$  DW),其次为太湖中的鳊鱼(85.67  $\mu\text{g/g}$  DW)。MC的测定方法以HPLC最多,ELISA次之,偶有使用LC-MS。

表 4-4 从野外采集到的鱼体内 MC 含量的比较

Table 4-4 A comparison of MC contents in fishes collected from field reported

种类 Species	器官 Organ	毒素 Toxin	最大浓度 Maximum concentration/( $\mu\text{g/g}$ )	分析方法 Analysis Method	地点 Location	文献 References
欧川鱈 <i>Platichthys flesus</i>	Liver, muscle	肝毒素 (节球藻毒素+MC)	0.40 (DW)	ELISA	波罗的海北部 Northern Baltic Sea	Sipiä et al. 2001
红胸罗非鱼 <i>Tilapia rendalli</i>	Liver, viscera, muscle	Hepatotoxin (nodularin + MC)	31.1, 71.6, 0.34 (WW)	HPLC-PDA	巴西一潟湖	Magalhães et al. 2001
鱼(无鱼名)	Muscle	MC	0.03 (DW)	ELISA	巴西 Sepetiba 湾	Magalhães et al. 2003
Fish (no name was given)					Sepetiba Bay in Brazil	
尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	Intestine, liver, kidney, muscle	MC	0.82, 0.53, 0.4, 0.10 (WW)	ELISA	埃及一鱼池	Mohamed et al. 2003
小鲤鱼 <i>Barbus</i> sp.	Muscle	MC-LR	0.12 (WW)	ELISA	A fish pond in Egypt	Vasconcelos 1999
乌头 <i>Lisa</i> sp.	Muscle	MC-LR	0.11 (WW)	ELISA	Guadiana 河(葡萄牙南部)	Vasconcelos 1999
一种鲤鱼 <i>Cyprinus</i> sp.	Muscle	MC-LR	0.28 (WW)	ELISA	Guadiana 河(葡萄牙南部)	Vasconcelos 1999
鲢 <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	Intestine, blood, liver, Kidney, bile, muscle	MC-LR+ MC-RR	137, 3.31, 1.16, 3.45, 3.1, 1.65 (DW)	HPLC-UV	Guadiana 河(葡萄牙南部)	Vasconcelos 1999
鳊 <i>Parabramis pekinensis</i>	Intestine, blood, liver, kidney, bile, muscle	MC-LR+ MC-RR	0, 8.25, 4.51, 1.46, 3.85, 0.66 (DW)	HPLC-UV	Guadiana 河(葡萄牙南部)	Vasconcelos 1999
鲫鱼 <i>Carassius auratus</i>	Intestine, blood, liver, kidney, bile, muscle	MC-LR+ MC-RR	6.22, 46.43, 1.76, 14.16, 2.58, 3.26 (DW)	HPLC-UV	中国巢湖 Lake Chaohu, China	Xie et al. 2005
鲤鱼 <i>Cyprinus carpio</i>	Intestine, blood, liver, kidney, bile, muscle	MC-LR+ MC-RR	6.46, 7.28, 8.45, 2.04, 0, 0.66 (DW)	HPLC-UV	中国巢湖 Lake Chaohu, China	Xie et al. 2005

种类	器官	毒素	最大浓度	分析方法	地点	文献
Species	Organ	Toxin	Maximum concentration/( $\mu\text{g/g}$ )	Analysis Method	Location	References
红鳍原鲌 <i>Culter erythropterus</i>	Intestine, blood, liver, kidney, bile, muscle	MC-LR+ MC-RR	3.8, 19.96, 11.6, 13.73, 8.41, 1.98 (DW)	HPLC-UV	中国巢湖 Lake Chaohu, China	Xie et al. 2005
翘嘴鲌 <i>Culter ilishaeformis</i>	Intestine, blood, liver, kidney, bile, muscle	MC-LR+ MC-RR	0, 4.08, 4.99, 0, 0, 2.73 (DW)	HPLC-UV	中国巢湖 Lake Chaohu, China	Xie et al. 2005
黄颡鱼 <i>Pseudobagrus-fulvidraco</i>	<sup>#</sup> Intestine, blood, liver, kidney, bile, muscle	MC-LR+ MC-RR	0, 11.88, 7.89, ND, ND, 1.94 (DW)	HPLC-UV	中国巢湖 Lake Chaohu, China	Xie et al. 2005
长颌鲚(刀鲚) <i>Coilia ectenes</i>	Muscle	MC-LR+ MC-RR	1.62 (DW)	HPLC-UV	中国巢湖 Lake Chaohu, China	Xie et al. 2005
胡瓜鱼 <i>Osmerus eperlanus</i>	Liver	MC-LReq	874 (AFDW)	HPLC-PDA	荷兰 IJsselmeer 湖 Lake IJsselmeer, Netherlands	Ibelings et al. 2005
一种欧洲鲈 <i>Gymnocephalus cernua</i>	Liver	MC-LReq	194 (AFDW)	HPLC-PDA	荷兰 IJsselmeer, Netherlands Lake IJsselmeer, Netherlands	Ibelings et al. 2005
河鲈 <i>Perca fluviatilis</i>	Liver	MC-LReq	51 (AFDW)	HPLC-PDA	荷兰 IJsselmeer 湖 Lake IJsselmeer, Netherlands	Ibelings et al. 2005
黑口新虾虎鱼 <i>Neogobius melanostomus</i>	Liver	MC-LReq	0.06-0.3 (WW)	ELISA	美国 Erie 湖 Lake Erie, USA	Babcock-Jackson et al. 2002
鲢 <i>Aristichthys nobilis</i>	Whole intestine, blood, liver, kidney, Gallbladder, muscle, Spleen, gill	MC-LR+ MC-RR+ MC-YR	85.67, 0.24, 2.83, 1.70, 0.83, 0.89, 1.57, 0.07 (DW)	LC-ESI-MS HPLC-UV	中国太湖 Lake Taihu, China	Chen et al. 2006

DW: 干重 dry weight; AFDW: 无灰干重 ash free dry weight; WW: 湿重 wet weight

Intestine: 肠道; blood: 血液; liver: 肝脏; kidney: 肾脏; muscle: 肌肉; spleen: 脾脏; gill: 鳃; viscera: 内脏

<sup>#</sup>MC 在肠含物中未检测到, 但在胃中检测到(1.26  $\mu\text{g/g}$  DW) No MC were present in the gut contents but present in the stomach (1.26  $\mu\text{g/g}$  DW)

# 第五章 软体动物对 MC 摄取和清除的实验研究

软体动物(蚌、螺)是重要的底栖动物，水体中悬浮的或基质表面附着的藻类为其主要食物，因而在出现有毒蓝藻水华的水体容易摄取和累积 MC。在一些国家(如中国)，螺、蚌广泛被人们食用，因此，软体动物 MC 污染导致的食用安全性问题不容忽视；软体动物又是底栖动物食性鱼类(如鲤鱼、青鱼等)的饵料，可将 MC 传递给鱼类进而影响人类食用；此外，含 MC 的软体动物还可被鸟类食用而危及生态安全。因此，MC 在软体动物体内的分布与迁移转化规律也受到广泛关注。

## 一、软体动物实验研究背景

### 1. 实验软体动物概况

贻贝[又名壳菜，隶属于贻贝科(Mytilidae)]肉味鲜美，除满足人们食用外，也被作为水产养殖混合饲料的动物蛋白源。紫贻贝 *Mytilus galloprovincialis*(图 5-1)属寒温带、广盐性种类，广泛分布于北半球。*M. edulis*(图 5-2)广泛分布于欧洲、北美、南美等地的海岸、河口等生境。



图 5-1 紫贻贝 *Mytilus galloprovincialis* 图片(引自 Libero: www.abissi.com)

Fig. 5-1 A photo of *Mytilus galloprovincialis* (Cited from Libero: www.abissi.com)

无齿蚌 *Anodonta grandis*(图 5-3)原产于美国东南部(Williams et al. 2001)，而无齿蚌 *A. cygnea*(图 5-4)为欧洲淡水双壳类的主要种类(Mille and Reynolds 2003)。圆顶珠蚌(*Unio douglasiae*)(图 5-5)广泛分布于我国(包括台湾)，在原苏联、朝鲜和日本也有分布；在我国，圆顶珠蚌可供人们食用，并可作家畜和家禽的饲料，也是

鱼类、禽类的天然饵料(齐钟彦 1996)。



图 5-2 贻贝 *M. edulis* 图片(引自 Peter H. van Bragt )

Fig. 5-2 A photo of *M. edulis* (Cited from Peter H. van Bragt)



图 5-3 无齿蚌 *Anodonta grandis simpsoniana* 图片(引自 Alberta 大学的 Hugh Clifford 博士)

Fig. 5-3 A photo of *Anodonta grandis simpsoniana*  
(by Dr. Hugh Clifford, University of Alberta)

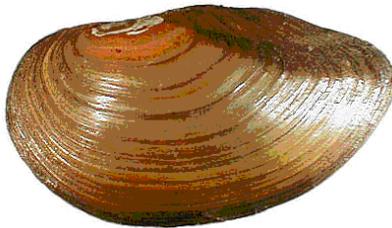


图 5-4 无齿蚌 *Anodonta cygnea* 图片(引自 Swedish Museum of Natural History,  
<http://www2.nrm.se/ev/musselnyckel>)

Fig. 5-4 Photo of *Anodonta cygnea* (Cited from Swedish Museum of Natural History,  
<http://www2.nrm.se/ev/musselnyckel>)



图 5-5 圆顶珠蚌图片(引自台湾中央研究院生物多样性研究中心, <http://shell.sinica.edu.tw>)  
Fig. 5-5 Photo of *Unio douglasiae* (Cited from Research Center for Biodiversity, Taiwan, <http://shell.sinica.edu.tw>)

斑纹蚌(*Dreissena polymorpha*)原产于前苏联的黑海(Black Sea)、里海(Caspian Sea)和咸海(Aral Sea)流域, 17 世纪被传入欧洲几个淡水港口, 现在已遍布欧洲, 也传入加拿大和美国; 斑纹蚌已对土著蚌类产生巨大影响, 被列为全世界 100 个最坏的入侵者(100 of the “World’s Worst” invaders)之一(Marsden 2005), 例如, 斑纹蚌可大量附着在土著蚌类身体上, 阻碍其贝壳的闭合(图 5-6)。



图 5-6 附着在东方美丽蚌上的斑纹蚌(引自加拿大自然资源博物馆 Rideau 河的自然网站)  
Fig. 5-6 Zebra mussel(*Dreissena polymorpha*) have attached themselves to an eastern lampmussel (*Lampsilis radiata*) (Cited from the Nature of the Rideau River Web site, created by the Canadian Museum of Nature)

石田螺 *Sinotaia histrica*[属田螺科(Viviparidae)]是日本的土居种, 常见于淡水湖泊和池塘中, 为鱼类和水禽的饵料(Ozawa et al. 2003)。

## 2. 研究背景

关于 MC 在软体动物体内分布与迁移转化的实验研究主要集中在海产或淡水

双壳纲(Bivalvia)[也称为瓣鳃纲(Lamellibranchia)或斧足纲(Pelecypoda)]动物, 偶有涉及腹足纲(Gastropoda)动物, 双壳纲动物包括贻贝科(Mytiloidea)的贻贝属(*Mytilus*)、蚌科(Unionidae)的珠蚌属(*Unio*)、无齿蚌属(*Anodonta*)和饰贝科(Dreissenidae)的饰贝属(*Dreissena*), 而腹足纲动物仅包括田螺科(Viviparidae)的 *Sinotaia* 属。

迄今为止较多的研究之所以集中在双壳类, 可能与其食性有关。双壳类主要为滤食性, 以口腔的唇瓣和鳃上的纤毛摆动或借助水管摄取水中悬浮食物——藻类、浮游动物、有机碎屑等; 而腹足类为舔食性, 通过发达的舌齿舔食水生植物叶子及附着在水下基质表面的藻类、细菌和真菌(刘月英等 1993, Smith 2001)。因此, 当水体中发生有毒蓝藻水华时, 双壳类由于其滤食特性, 更易暴露于 MC 的风险之中。

在欧洲和北美, 海洋软体动物是人们重要的食物, 而人们很少食用淡水软体动物。然而, 在富营养湖泊的河口(estuary), 可能会发生海洋软体动物与淡水蓝藻的接触, 因而河口被认为在蓝藻毒素通过食物链传递的过程中起到重要作用。因此, 一些学者模拟河口发生微囊藻水华的实验来研究海贝对 MC 的摄取和清除规律, 其中贻贝是重要的实验材料(Vasconcelos 1995, Amorim and Vasconcelos 1999)。

在荷兰, 斑纹蚌已成为浅水湖泊食物网的重要成分, 例如, 在 IJsselmeer 湖(国际重要湿地之一)的夏秋季, 蚌(因其滤食特性)暴露于高密度的蓝藻, 而在秋冬季大量迁徙性底栖动物食性鸟类(visiting benthivorous birds)[如斑背潜鸭(*Aythya marila*)、凤头潜鸭(*A. fuligula*)]又以这些蚌为食, 因此荷兰科学家研究了 MC 通过蚌对这些鸟类的潜在威胁(Pires et al. 2004)。

在日本, 由于石田螺 *Sinotaia histrica* 为鱼类和水禽的饵料, MC 通过 *S. histrica* 在食物链中的传递受到关注(Ozawa et al. 2003)。

## 二、海产紫贻贝对 MC 的摄取和清除规律

葡萄牙学者(Vasconcelos 1995, Amorim and Vasconcelos 1999)在实验条件下, 研究了紫贻贝 *Mytilus galloprovincialis* 对微囊藻毒素的摄取和清除规律。用于实验的紫贻贝采自葡萄牙 Foz do Douro(Porto)海岸的一个潮间带种群(an intertidal population)。在该采集地, 紫贻贝未受到蓝藻毒素的污染。用于毒性实验的藻类为铜绿微囊藻 *Microcystis aeruginosa*-IZANCYA2(分离自葡萄牙的 Mira 湖)。该株铜绿微囊藻主要产 MC-LR(占 95%), 仅含有少量的 MC-LA 和[D-Asp<sup>3</sup>]-MC-LR。

### 1. Vasconcelos 的实验

Vasconcelos(1995)在实验中使用了 3 个各装有 20 L 自然海水和 2cm 厚沙石的

水箱，每个水箱饲养 120 只紫贻贝[体长(3.46 ± 0.12) cm；干重(0.15 ± 0.04) g]，连续充气，水箱的水每两天更换一次。水温条件为 16℃。该实验由两部分组成，第一部分为摄取(uptake)实验。紫贻贝每天用 *M. aeruginosa*-IZANCYA2 饲养(1 × 10<sup>5</sup> 个/mL)，共持续 16 天。在此期间，移出死亡的动物。在实验开始的第 1、2 天各取 20 个紫贻贝进行毒素分析，之后每隔一天取样分析，直至第 16 天。同时每天测定用于食物的 *M. aeruginosa*-IZANCYA2 中的毒素含量。第二部分为净化(depuration)实验。在经过 16 天的摄取实验后，对剩余的紫贻贝投喂菱形藻(*Nitzschia*，一种单细胞硅藻)和卡德藻(*Tetraselmis*，一种单细胞绿藻)混合饵料。而对照组在两个实验期间均保持饥饿状态。紫贻贝体内(包括各组织)毒素含量的测定用 HPLC 法。

在投喂 *M. aeruginosa*-IZANCYA2 的情况下，摄取实验期间的累计死亡率仅为 0.5%，清除实验结束时的累计死亡率为 6%，而在未投喂或投喂菱形藻和卡德藻的情况下，均未出现死亡。通过解剖，发现紫贻贝的肠道呈绿色，表明对微囊藻的大量摄食。

投喂 *M. aeruginosa*-IZANCYA2 的第 2 天即检测到少量的毒素(图 5-7)，表明毒素的摄取很快。第 10 天以前，摄取率十分稳定，然后有轻微下降，在接下来的 6 天保持稳定。每日投喂给紫贻贝的毒素量为(153 ± 74) μg，毒素的摄取率在第 2 天为 54.8%，在第 16 天为 24.1%。紫贻贝体内最大毒素含量出现在第 10 天，为 10.52 μg/g。从毒素在紫贻贝体内各器官的分布情况(根据实验结束时的样本分析)来看，主要分布在消化道(digestive tract)，而其他器官(鳃、足、肌肉和其他组织)合起来不足 4%。

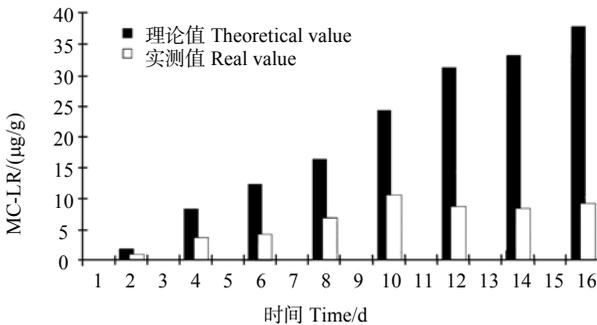


图 5-7 在 16 天摄取实验中，紫贻贝体内 MC-LR 含量(μg/g)及最大的理论累积量的变化(引自 Vasconcelos 1995)

Fig. 5-7 Uptake of MC-LR (μg/g) in the mussels and maximum theoretical accumulation value during the 16-day experiment (Cited from Vasconcelos 1995)

当食物切换到海洋藻类(菱形藻+卡德藻)后，紫贻贝体内的毒素含量在 3 天内降低了 50%(这可能与紫贻贝排空了消化管中的微囊藻有关)，而从第 3 天到第 7 天反而上升(可能由于在此期间，紫贻贝释放了与蛋白磷酸酶结合的 MC-LR)，然后再下降，至第 13 天降低到无法检测的水平(图 5-8)。

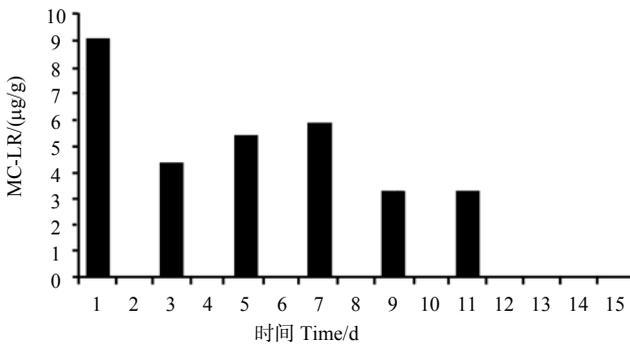


图 5-8 在 15 天清除实验中, 紫贻贝体内 MC-LR 的含量( $\mu\text{g/g}$ )的变化(引自 Vasconcelos 1995)

Fig. 5-8 Depuration of MC-LR ( $\mu\text{g/g}$ ) from the mussels during the 15-day experiment  
(Cited from Vasconcelos 1995)

紫贻贝对 MC-LR 摄取的实际值明显低于根据每日 MC-LR 的投喂量与每天紫贻贝的个体数量所计算而得的理论值(反映紫贻贝体内可能出现的最大毒素含量)。Vasconcelos (1995)认为可能因为以下原因: ① 不是所有的 MC-LR 都会被吸收, 因为其中的一部分可能随粪便(faeces)或伪粪便(pseudofaeces)排出; ② 而另外一部分可能不可逆地与蛋白磷酸酶结合或者被代谢了; ③ 也有可能因为供给紫贻贝的微囊藻细胞密度高, 导致紫贻贝滤食率的下降, 从而导致了摄取 MC-LR 量的降低。由于 MC-LR 能强烈地抑制真核细胞(eucaryotic cell)中两种蛋白磷酸酶(PP-1、PP-2A)的活性, 而且 MC-LR 与 PP-1、PP-2A 的结合非常牢固(MacKintosh et al. 1990, Honkanen et al. 1990), 紫贻贝体内所能检测到的 MC-LR 为与蛋白磷酸酶结合不紧的那部分或者为紫贻贝消化管中的毒素(Vasconcelos 1995)。因此, 这也是从动物组织中萃取和测定 MC-LR 所面临的一个问题。

Vasconcelos(1995)认为, 如以紫贻贝为食, 紫贻贝中 MC-LR 的含量与其实验中的水平相当, 假如每人摄食含 MC-LR  $10.5 \mu\text{g/g DW}$  的紫贻贝  $625 \text{ g FW}$ , 那么可摄取大约  $250 \mu\text{g}$  的毒素。

## 2. Amorim 和 Vasconcelos 的实验

Amorim 和 Vasconcelos(1999)基本重复了 Vasconcelos(1995)的实验, 只是将摄取期缩短为 4 天, 并同时监测了水和粪便中 MC 含量的变化, MC-LR 的分析改为 ELISA 法(检测限为  $0.1 \text{ ng/mL}$ )。

Amorim 和 Vasconcelos(1999)实验的平均水温为  $(17 \pm 1) ^\circ\text{C}$ , 盐度为  $(33 \pm 1) \text{‰}$ , 连续充气。实验前紫贻贝的养殖密度保持在低于 100 个/40 L 的水平, 每天投喂菱形藻。实验使用了两个 40 L 的 PVC 桶, 各盛有 10 L 过滤并用 UV 杀菌的自然海水, 每个桶中放养 30 个紫贻贝, 每天两次(早、晚)投喂 *Microcystis aeruginosa*-IZANCYA2(保持细胞密度为  $10^5$  个/mL), 持续投喂 4 天。在此期间, 每天随机地

取 3 个紫贻贝(除掉壳)用于毒素分析, 随即加入 3 个标记的紫贻贝以维持实验期间密度一致。

在第 5 天, 将桶中的水全部换掉, 加入新过滤和消毒过的海水。取 6 个紫贻贝分别饲养在 6 个各盛有 100 mL 海水的 250 mL 的烧杯中, 喂以  $1 \times 10^5$  个/mL 的菱形藻, 而其他紫贻贝仍然留在桶中。经过 24 h, 取 3 个单独用烧杯饲养的紫贻贝用于毒素含量分析, 收集烧杯中的水分析水中的毒素含量, 待烧杯中的粪便沉淀后, 用 GF/C 滤膜过滤, 烘干用于毒素分析。在接下来的 14 天, 每天从大桶中取 3 个紫贻贝, 按上述程序进行处理。同时, 在清除实验开始的第一天, 取 3 个紫贻贝分别单独饲养在烧杯中, 每天喂以菱形藻, 但始终保持不换水, 在第 14 天, 它们作为“其他紫贻贝”。

在 4 天的摄取实验期间, 无紫贻贝死亡。微囊藻细胞 MC 的平均含量为  $3.4 \mu\text{g}/10^7$  个细胞。在累积实验期间, 紫贻贝个体间毒素含量的差异巨大, 平均毒素含量的最大值为  $10.7 \mu\text{g}/\text{g DW}$ 。而在清除实验开始的最初两天, 紫贻贝体内可检测的毒素含量达到  $16 \mu\text{g}/\text{g DW}$  的最大值, 然后呈现逐步下降的趋势, 经过两个星期后, 其体内的毒素含量仍然超过  $1 \mu\text{g}/\text{g DW}$ ; 前述的“其他紫贻贝”在清除实验的第 14 天其体内的含量为  $2.5 \mu\text{g}/\text{g DW}$ [图 5-9(A)]。

在清除实验中, 将紫贻贝放置 24 h 后, 最初的 5 天, 水中的毒素含量呈现下降的趋势, 然后在第 8 天和第 12 天分别出现两个峰值, 变异很大[图 5-9(B)]。Amorim 和 Vasconcelos(1999)认为, 这些结果表明了 MC 向水中的一种有规律性的释放, 可能是由于某种排泄机制, 或者可能与蛋白磷酸酶的更新而伴随的先前结合的 MC 的释放有关。一般来说, 共价地与蛋白磷酸酶 PP-1 和 PP-2A 结合 (MacKintosh and MacKintosh 1994), 使 MC 中有相当多的部分用 HPLC 和 ELISA 这样的方法无法检测。虽然 MC 与 PP-1 和 PP-2A 的结合被认为非常强烈及不可逆转(irreversible)(Takai et al. 1995), 但 Amorim 和 Vasconcelos(1999)认为, 紫贻贝在解毒(detoxification)过程中可能使 PP-1 和 PP-2A 失活, 而释放出 MC, 再通过粪便或尿排泄出这些非结合(unbound)的 MC。

在清除实验最初的 3 天, 粪便中的毒素含量不断增加, 最高达  $140 \mu\text{g}/\text{g DW}$ , 然后迅速下降, 至第 14 天, 毒素含量降到几乎不能检测的水平[图 5-9(C)]。前述紫贻贝体内的毒素含量在第 3 天降低了 50%以上可用通过粪便排出了大量的毒素来予以解释。Amorim 和 Vasconcelos(1999)认为, 在清除实验的前 3 天, 毒素含量不断增加的机制还不很清楚, 可能与紫贻贝重新摄食毒素含量高的粪便有关。

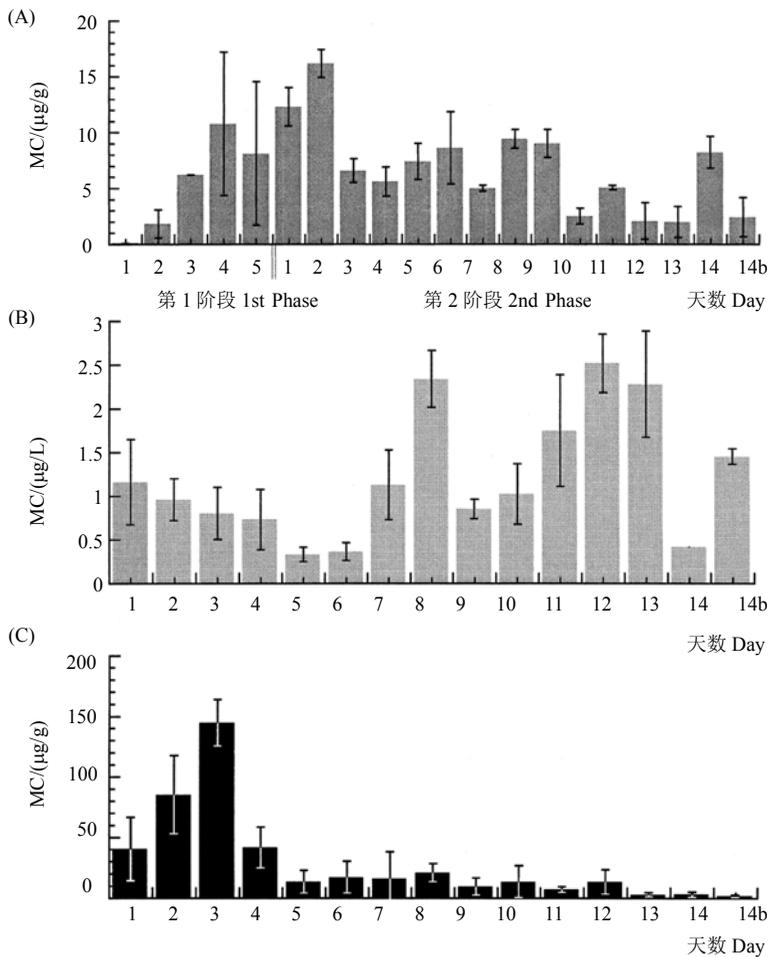


图 5-9 在累积(第 1 阶段)和清除(第 2 阶段)期, 贻贝体内[(A),  $\mu\text{g/g}$ ]、水中[(B),  $\mu\text{g/L}$ ]和粪便[(C),  $\mu\text{g/g}$ ]中 MC 的含量, 垂线为标准差(引自 Amorim & Vasconcelos 1999)

Fig. 5-9 MC concentrations in the mussels (A)  $\mu\text{g/g}$ , water (B)  $\mu\text{g/L}$  and faeces (C)  $\mu\text{g/g}$  during the accumulation (1st phase) and depuration (2nd phase) periods. Vertical bars represent standard deviation (Cited from Amorim and Vasconcelos 1999)

在清除实验中, 从紫贻贝、水和粪便中的 MC 含量总和及其组成百分比的变化情况来看, 可测定的 MC 总量每隔 2~3 天出现峰值, 除了最初的 4 天外, 环境中可测定的毒素含量的大部分存在于水(而非粪便)中(图 5-10)。Amorim 和 Vasconcelos(1999)认为, 这一结果表明紫贻贝可能通过尿活跃地向水中排泄 MC。

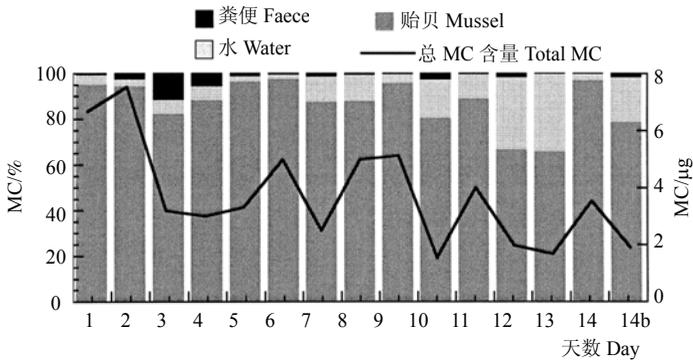


图 5-10 清除期贻贝体内、水中和粪便中的 MC 含量的比例(%)及总(贻贝+水+粪便) MC 含量(μg)的变化(引自 Amorim and Vasconcelos 1999)

Fig. 5-10 Variation of the proportion of microcystin in the mussels, water and faeces during the depuration period (%) and total amount (μg) of MC (water + faeces + mussel) (Cited from Amorim and Vasconcelos 1999)

### 三、海产贻贝对 MC 的摄取和清除规律

加拿大科学家 Williams 等(1997c)在实验条件下,研究了贻贝 *Mytilus edulis* 对 MC 的摄取和清除规律。用于实验的 *M. edulis* 采自加拿大的 Campbell 河 (Whiterock, B.C.)的河口或美国的 Townsend 港(WA)。用于进行毒性实验的藻类采自加拿大的 Little Beaver 湖中的水华, 主要种类为铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)。

用于清除研究的 *M. edulis*[共 100 个, 平均体长(3.3 ± 0.5) cm]采自加拿大 Pacific Biological Station (Nanaimo, B. C.), 然后放置在一流动的(flow-through)盛有 53 L 海水的水箱中。关掉流动的海水, 使这一开放系统(open-system)的水族箱保持 10 °C 的水温并充气。此时, 取 10 个蚌作为对照( $T_{control}$ ), 然后投喂 5.3 g 的冰冻干蓝藻粉。3 天后, 水族箱的水变干净, 再恢复水体流动。3 天的时间可作为海洋藻类水华发生时期的代表, 而藻类水华也是海洋环境中微囊藻毒素的可能来源。此时, 再取 10 个蚌( $T_0$ )。然后在第 4、11、25 和 53 天( $T_4$ 、 $T_{11}$ 、 $T_{25}$ 、 $T_{53}$ )分别取 10 个蚌。将 10 个蚌的软组织绞碎、称重(7~10g WW), 然后分成两个样品。

结果表明, 当蚌转移到不含蓝藻粉的海水中时, 能迅速地清除共价结合的和游离的 MC: 根据 Lemieux 氧化气质联用(Lemieux Oxidation GC/MS)法的测定结果, 经过 4 天的时间, 蚌组织中 MC 的含量从(336.9 ± 45.8) μg/g WW 降至 (11.3 ± 2.6) μg/g WW, 4 天后至实验结束, 含量始终在 GC/MS 测定法的检测限以下(表 5-1); 根据蛋白磷酸酶(PPase)法的测定结果, 经过 53 天后, 蚌组织中甲醇可萃取(MeOH-extractable)游离 MC, 从最初的 204 ng/g WW 降至 14 ng/g WW。根

据 GC/MS 法的测定结果,  $T_0$  时蚌体内 MC 的生物富集, 基本上达到了向水族箱中投入 5.3 g 干蓝藻粉所含 MC 的 100%。由于甲醇可萃取 MC 不到 MC 总负荷的 0.1%, Williams 等(1997c)认为, 在有关蚌的监测中, 需要检测的是总 MC 负荷。

表 5-1 Lemieux 氧化气质联用法与蛋白磷酸酶检测法所分析的贻贝  
(所有组织)中 MC 含量的比较

Table 5-1 Comparison of the Lemieux oxidation GCMS method and PPase assay in the analysis of MC in whole mussel tissues

样品 Sample	Lemieux 氧化气质联用 Lemieux oxidation and GC/MS		蛋白磷酸酶检测 PPase assay	
	$\mu\text{g MC/g}$ 湿贻贝组织 $\mu\text{g MC/g wet mussel tissue}$	$\mu\text{g MC/g}$ 贻贝 $\mu\text{g MC/g mussel}$	$\mu\text{g MC/g}$ 湿贻贝组织 $\mu\text{g MC/g wet mussel tissue}$	$\mu\text{g MC/g}$ 贻贝 $\mu\text{g MC/g mussel}$
	Campbell 河	63.3 ± 11.3	56.6 ± 10.1	0.022
Townsend 港	nd	nd	0.017	0.015 ± 0.003
$T_{\text{control}}$	3.4 ± 1.0	3.7 ± 1.1	0.015	0.016
$T_0$	336.9 ± 45.8	285.6 ± 38.8	0.204	0.173
$T_4$	11.3 ± 2.6	8.8 ± 2.1	0.043	0.034
$T_{11}$	nd	nd	0.042	0.029
$T_{25}$	nd	nd	0.024	0.025
$T_{53}$	nd	nd	0.014	0.008

数据为代表性浓度范围内 3 个重复样的平均值 ± S.D.

Values are means ± S.D. obtained from triplicate calibration within a representative concentration range. nd 表示未检测出 nd, not detectable (引自 Williams et al. 1997c) (Cited from Williams et al. 1997c)

## 四、淡水无齿蚌 *Anodonta cygnea* 对 MC 的摄取和清除规律

### 1. 用培养的有毒阿氏颤藻 CYA-38 进行的实验

芬兰学者 Eriksson 等(1989a)进行了淡水无齿蚌 *Anodonta cygnea* 对一种产自阿氏颤藻 *Oscillatoria agardhii* 的肝毒素累积的实验研究, 他们将这种毒素称为颤藻毒素(*Oscillatoria toxin*), 但是, 根据他们确认的分子结构特征(含  $\beta$ -氨基酸 Adda 和 *N*-甲基脱氢丙氨酸), 该毒素应作为一种微囊藻毒素。因此, 他们的研究也是关于软体动物对 MC 累积的最早的研究。

实验动物为无齿蚌 *Anodonta cygnea*, 采自位于芬兰西北部的 Littpistenjärvi 湖, 用于实验的蚌的体长为(9 ± 2) cm。实验中所用的蓝藻为来自挪威水研究所(Norwegian Institute for Water Research)的有毒的阿氏颤藻 CYA-38(分离自挪威的 Gjersjön 湖), 藻类培养在容积为 20 L 的有机玻璃器皿中进行, 从采集蚌的湖中取湖水, 反复深冻(deep-freezing)以杀死其他蓝藻, 并加入营养盐, 使其大致接近 20%

Z8, 然后将其作为阿氏颤藻的培养液。实验条件为 20 °C 的温度及连续的光照条件[20~40  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ]下进行。

实验在 40 L 的玻璃水族箱中进行, 水族箱底部覆盖有干净的沙子, 为蚌提供基质。颤藻通过蠕动泵(peristaltic pump)输送到水族箱再返回到藻类培养容器中, 依此反复。通过调节流速使水族箱中的颤藻浓度维持在 10~20 mg/L, 这接近自然富营养环境中的可能浓度范围。该颤藻的毒素含量为 2~3 mg/g 干藻粉(冷冻干燥), 因此水族箱中的毒素含量为 40~60  $\mu\text{g}/\text{L}$ 。

将蚌暴露于有毒蓝藻 15 天(在此期间采蚌进行毒素分析)后, 将剩余的蚌转入不含有毒蓝藻的水族箱中继续饲养, 对照蚌仅接触不含有毒蓝藻的湖水。取蚌的软组织(soft tissue), 将 3 个蚌软组织合并为一个样进行毒素分析。另外, 将一些蚌在相对较低的有毒蓝藻的浓度下饲养 30 天后, 转入清水中再饲养 5 天, 然后取软组织用于确定各器官中毒素含量的分布(各器官均为 5 个个体合并的混合样)。组织样品进行深冻(-20 °C)后, 冷冻干燥。毒素的分析用 HPLC 法。

蚌对毒素的累积十分快(图 5-11), 经过 15 天, 蚌体内毒素的平均含量高达 70  $\mu\text{g}/\text{g}$  DW; 将蚌转入清洁水中饲养 2 个月后, 蚌体内的毒素仍然可检测出。从毒素在器官中的分布情况来看, 肝胰腺的含量最高, 虽其干重仅占蚌总重量的 3.5%, 但毒素含量已占到总毒素含量的 40%(图 5-12), 肠道、性腺和肌肉的含量较低, 而其余的毒素存在于其他组织[肾脏和结缔组织(connective tissue)]中, 虽然其含量较低。

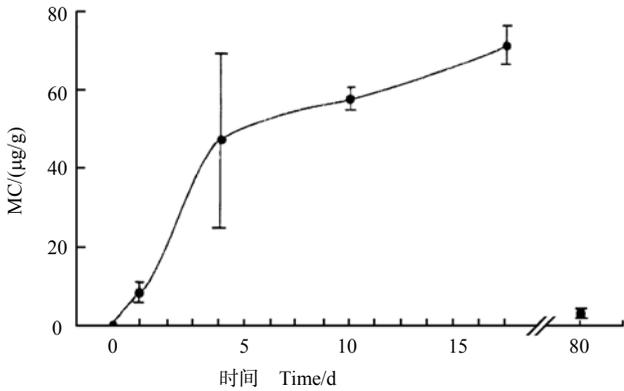


图 5-11 暴露在有毒阿氏颤藻的实验条件下, 无齿蚌 *Anodonta cygnea* 对 MC 的累积。最后一次测定(第 80 天)是将无齿蚌转移到纯湖水中经过 65 天后进行的。垂线表示 2 或 3 个样的浓度范围(引自 Eriksson et al. 1989a)

Fig. 5-11 Accumulation of MC in a freshwater mussel, *Anodonta cygnea*, exposed to toxic *Oscillatoria agardhii*. The last measurement at 80 days was made after the mussels had been kept in pure lake water for 65 days after exposure. Vertical bars show the range of concentrations in 2 or 3 samples (Cited from Eriksson et al. 1989a)

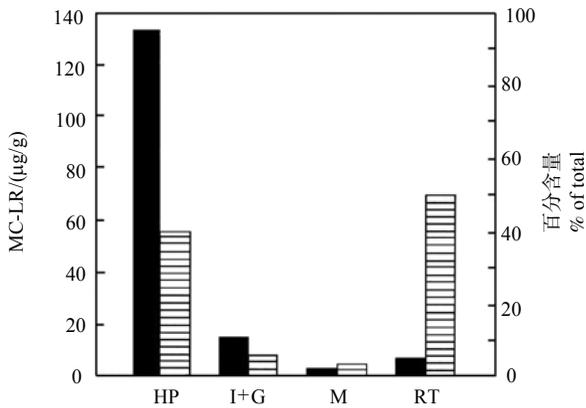


图 5-12 暴露于低浓度有毒阿氏颤藻 30 天后, MC 在无齿蚌 *Anodonta cygnea* 各器官中的分布(引自 Eriksson et al. 1989a)

黑棒表示不同器官中的毒素含量( $\mu\text{g/g}$  干组织), 条纹棒表示在整个蚌毒素含量中, 不同组织的相对含量(%)。

在该实验中, 整个蚌的毒素含量为  $11.9 \mu\text{g/g}$  干组织。缩写: HP: 肝胰腺; I + G: 肠道 + 性腺;

M: 肌肉; RT: 剩余的其他组织

Fig. 5-12 Organ distribution of MC in a freshwater mussel, *Anodonta cygnea*, after 30 days of exposure to low densities of toxic *Oscillatoria agardhii* (Cited from Eriksson et al. 1989a)

The black bars show the toxin concentrations ( $\mu\text{g/g}$  freeze dried tissue) in the different organs and the striped bars show the relative amounts (%) of toxin in the different tissues as related to the total toxin content in the mussels. The toxin concentration found in the whole mussels in this trial averaged  $11.9 \mu\text{g/g}$  freeze dried tissue. Abbreviations:

HP: hepatopancreas; I + G: intestine + gonads; M: muscles; RT: remaining tissues

当用 HPLC 分析蚌组织的萃取物时, 收集与毒素纯品具相同保留时间的色谱峰处的物质, 通过腹腔注射的方式进行白鼠生物测试(mouse bioassay)。所用的白鼠为 SVR 雄鼠(体重 20~23 g)。腹腔注射通过这种方式所收集的蚌组织萃取物及毒素纯品时, 均导致白鼠 1~3 h 内死亡, 表明毒素可能未被蚌代谢。

这也是首次将投喂有毒蓝藻的蚌组织中的毒素萃取物注射到白鼠腹腔证实其毒性仍然存在的实验, 这也表明摄食被藻毒素污染的蚌对哺乳动物的毒性风险很大。

## 2. 用采自 Östra Kyrisundet 湖表层水中的有毒颤藻进行的实验

芬兰学者 Lindholm 等(1989)通过水族箱实验研究了无齿蚌 *Anodonta cygnea* 对颤藻毒素(*Oscillatoria toxin*)的累积规律。如前所述, 这种颤藻毒素应属于一种微囊藻毒素。

所用的水族箱大约 20 L。用于实验的 *A. cygnea* 采自 Långsjön 湖, 在该湖未观察到有毒的蓝藻。在一个水族箱灌入采自 Östra Kyrisundet 湖的富含有毒颤藻的表层水, 再放入 10 个 *A. cygnea*; 在另一个水族箱灌入采自 Östra Kyrisundet 湖 12 m 深处的相对干净的水, 再放入 10 个 *A. cygnea*。水族箱中的水一周更换 2 或 3 次。

经过一个星期后,在上述水族箱各取 10 个蚌深冻用于毒素分析。浮游植物和软体动物体内的毒素分析采用 HPLC 法。

将 *A. cygnea* 暴露在富含毒颤藻的表层水中一个星期后,蚌软组织中的 MC 含量达到大约 30  $\mu\text{g/g DW}$ , 而将 *A. cygnea* 置于从 12 m 深处采集的相对干净的水中则没有毒素积累。Östra Kyrisundet 湖表层水(0~6 m)的浮游植物体内毒素含量大约为 25~37  $\mu\text{g/L}$ , 而从 12 m 深处采集的湖水几乎无毒素存在。

## 五、淡水无齿蚌 *Anodonta grandis simpsoniana* 对 MC 的摄取和清除规律

加拿大学者 Prepas 等(1997)进行了一个短期(3 天)的实验,以确定无齿蚌 *Anodonta grandis simpsoniana* 或 *Pyganodon grandis simpsoniana* 是否对溶解在水中的高含量的 MC-LR 进行积累;此外,在现场条件下研究了无齿蚌对 MC-LR 的积累与清除规律。该种无齿蚌采自加拿大 Alberta 的 Narrow 湖(Edmonton), 体长 65~75mm。蚌体和水中溶解的藻毒素用蛋白磷酸酶(PPase)法进行测定,在湖泊中浮游植物体内的藻毒素用 HPLC 法进行分析。

### 1. 对溶解性 MC 的累积

Prepas 等(1997)将无齿蚌饲养在 6 个 10 L 的水族箱中,每个水族箱饲养 30 个无齿蚌,实验温度为 20  $^{\circ}\text{C}$ 。每天将每个水族箱一半的水(4.5 L)换掉以防废物的积累,再加 0.5 L 绿藻为无齿蚌供给食物。在其中的 3 个水族箱中每天加入足够量的 MC-LR,使其在 3 天的实验期间 MC-LR 的含量保持在 51~55  $\mu\text{g/L}$ (这样高的胞外 MC 含量在自然水体中一般是不会出现的),另 3 个水族箱为对照,不加入 MC-LR。每天从每个水族箱中随机地取 3 个无齿蚌,取软组织用于分析毒素。结果表明,无齿蚌体内的 MC-LR 低于检测限( $\text{ng/g}$ ),说明无齿蚌经过 3 天与高含量的溶解性 MC-LR 的接触,毒素并未在体内积累。

### 2. 湖泊中有毒蓝藻细胞内 MC 的累积

Prepas 等(1997)在 9 个小塑料托盘(plastic tray)(11 cm  $\times$  80 cm  $\times$  40 cm)中放入干净的沙子基质并用金属丝覆盖,在其中各放 12 个无齿蚌。将无齿蚌置于作为城市饮用水源地的 Alberta 中部的 3 个富营养或超富营养湖泊中,这些湖泊中的优势蓝藻为铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)、念珠藻(*Anabaena* spp.)、水华束丝藻(*Aphanizomenon flos-aquae*)、席藻(*Phormidium* spp.)和束球藻(*Gomphosphaeria* sp.),主要产生的微囊藻毒素为 MC-LR,其中细胞内 MC-LR 的含量在 Coal 湖小于 0.005  $\mu\text{g/L}$ ,在 Little Beaver 湖为 0.82~1.92  $\mu\text{g/L}$ ,在 Driedmeat 湖为 1.32~8.2  $\mu\text{g/L}$ 。每个湖泊设 3 个地点,每个地点放一个托盘,置于 1 m 水深的湖底,每次采样时,

从每个托盘中随机地采集 3 个活的无齿蚌，同时将已死亡的个体丢掉。无齿蚌于 1992 年 8 月 11 日放置到 Coal 湖, 8 月 13 日放置到 Little Beaver 湖和 Driedmeat 湖。

在 Coal 湖, *M. aeruginosa* 在浮游植物生物量中的比例相对较低( $\leq 3\%$ ), 浮游植物细胞体内的毒素含量在检测限以下, 然而, 无齿蚌经过 28 天的累积, 其体内可检测的毒素含量达到  $(24 \pm 7) \text{ ng/g}$ (图 5-13), 这表明, 无齿蚌在湖泊中浮游植物细胞内藻毒素含量很低时, 可以进行毒素的生物富集。

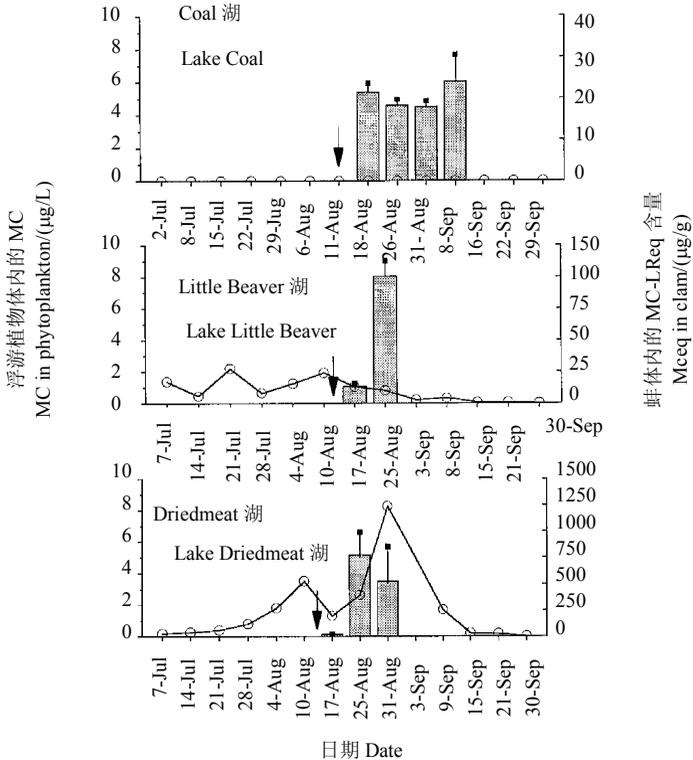


图 5-13 在 Coal、Little Beaver 和 Driedmeat 三个湖泊中浮游植物胞内 MC-LR 含量(HPLC 法测定、空心圆圈)和蚌累积的 MC-LR 含量(蚌整体的毒素含量用 PPases 法测定、黑柱状棒) (引自 Prepas et al. 1997)

箭头表示将蚌放入湖泊的日期; 注意不同湖泊的 MC-LR 浓度的刻度不同; 误差线: 1SE  
 Fig. 5-13 MC-LR concentrations in the phytoplankton (by HPLC; open circles) and microcystin (MC-LR) concentrations accumulated in clams (whole clam, by PPases bioassay; shaded bars) in Coal, Little Beaver, and Driedmeat lakes (Cited from Prepas et al. 1997)

Arrows indicate the dates when clams were placed into lakes. Note scale change in MC-LR concentration across lakes. Error bars: 1SE

在 Little Beaver 湖和 Driedmeat 湖, 实验期间的平均毒素(MC-LR)含量分别为  $(1.26 \pm 0.33) \text{ µg/L}$  和  $(3.94 \pm 1.35) \text{ µg/L}$ , 无齿蚌体内的毒素含量在实验的第 4 天为

$(13 \pm 2) \mu\text{g/L}$  和  $(21 \pm 5) \text{ng/g}$ ，而在实验的第 12 天分别猛增到  $(100 \pm 12) \mu\text{g/L}$  和  $(776 \pm 215) \text{ng/g}$ 。一般来说，湖泊中浮游植物细胞内 MC-LR 含量越高，无齿蚌体内的毒素含量也越高。

无齿蚌体内的毒素含量在每个湖泊中的不同站点间也存在很大变异，Prepas 等(1997)认为这可能是由于有毒 *M. aeruginosa* 在空间上的丰度差异及无齿蚌滤食率的差异所致。

上述室内和野外现场实验表明，将无齿蚌置于高达  $55 \mu\text{g/L}$  的 MC-LR 溶液中 3 天，其体内的毒素也未积累到可以检测的水平，而将其置于浮游植物毒素含量小于  $4 \mu\text{g/L}$  MC-LR 的湖泊中 4 天后，无齿蚌体内的毒素便达到可以检测的水平[在 Little Beaver 湖和 Driedmeat 湖分别为  $(13 \pm 2) \text{ng/g}$  和  $(21 \pm 5) \text{ng/g}$ ]。也就是说，无齿蚌对 MC-LR 的积累主要是通过摄食有毒的浮游植物，而极少通过直接对溶解毒素的吸收。

### 3. 对 MC 的清除模式

1993 年 9 月，将无齿蚌放置到 Driedmeat 湖共 24 天，其间浮游植物 MC-LR 的平均含量为  $(2.78 \pm 0.61) \mu\text{g/L}$ ，无齿蚌体内的 MC-LR 的平均含量为  $(369 \pm 47) \text{ng/g}$ ，毒素主要分布在内脏团(visceral mass)[占  $(55 \pm 10)\%$ ]，鳃(gill)和肌肉组织(muscle tissue)各占  $(23 \pm 8)\%$ 和  $(23 \pm 3)\%$ 。

虽然内脏团的高 MC-LReq 可能来源于其中未被消化的有毒蓝藻及穿透到细胞间的 MC-LReq，这一假设并不被无齿蚌身体三部分的毒素清除模式所支持(图 5-14)：将无齿蚌从毒源中移出并喂以无毒的绿藻，经过 6 天后，其累积的毒素的

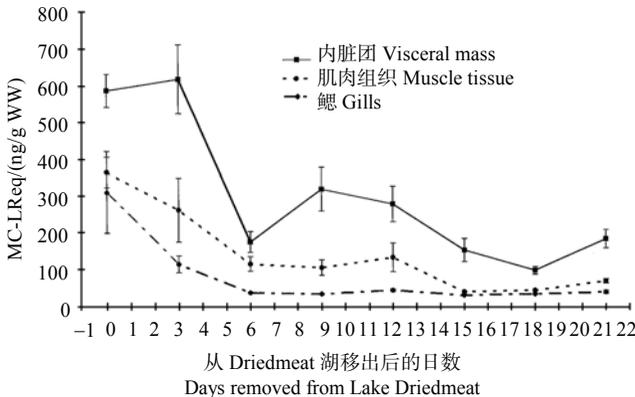


图 5-14 将无齿蚌暴露在含有毒藻类的 Driedmeat 湖中 24 天(第 0 天)后，再移入实验室内盛有脱氯水和绿藻的水族箱中饲养 21 天，其间无齿蚌内脏团、鳃、肌肉(足和肌肉)中 MC-LReq 的含量组织中的浓度基于干重，误差线=1 SE(引自 Prepas et al.1997)

Fig. 5-14 MC-LReq concentrations in visceral mass, gills, and muscle tissue (foot and adductor muscles) of clams after exposure to toxic phytoplankton in Driedmeat Lake for 24 days (day 0) and subsequent confinement in laboratory aquaria with dechlorinated water and green algae for up to 21 days. Tissue concentrations are on a dry weight basis. Error bars = 1 SE (Cited from Prepas et al.1997)

71%被清除(内脏团、鳃和肌肉的清除率分别为 70%、88%和 69%)。因此, Prepas 等(1997)认为, 无齿蚌身体三部分器官相似的清除模式暗示无齿蚌内脏团中高毒素含量的出现不是由于未消化有毒藻类的存在, 而可能是因为这些器官较多地接触(可能选择性地生物浓缩)了 MC-LR。

无齿蚌对 MC-LReq 的清除模式表现出两个阶段: 在清除实验的第 6~21 天, 内脏团和鳃中的毒素未进一步丧失, 而肌肉中的毒素的清除率有轻微的上升(从第 6 天的 69%到第 21 天的 81%)。从总体上看, 无齿蚌体内自由的 MC-LR 的 29% 经过 24 天仍然还存在, 表明 MC-LReq 同时具有短暂和稳定的形态。

## 六、淡水圆顶珠蚌 *Unio douglasiae* 在不同温度条件下对 MC-LR 的摄取和清除规律

日本学者 Yokoyama 和 Park(2003)研究了在实验室不同温度条件下, 圆顶珠蚌 *Unio douglasiae* 对 MC-LR 的摄取和清除规律。用于毒性实验的蓝藻为 *Microcystis ichthyoblabe* (TAC95), 仅产 MC-LR(13.7 mg/g DW)。用于实验的圆顶珠蚌采自日本 Suwa 湖南岸。由于这些蚌肝胰腺中的 MC 含量高达 60  $\mu\text{g/g}$  DW 以上, 实验前在不含微囊藻的池塘中饲养 3 个月以彻底地清除毒素。将饲养在池塘中的 60 个蚌随机地分成 4 组(每组含 15 个)转移到 4 个装有 15 L 脱氯自来水以及铺有干净人工海沙作为基底的玻璃水族箱中, 并不断充氧。摄取实验开始前, 将这些蚌分别在 15  $^{\circ}\text{C}$  或 25  $^{\circ}\text{C}$  水温条件下驯养 10 天, 喂以冷冻干燥(freeze-dried)的无毒的直链硅藻(*Melosira*)。

毒素摄取实验: 实验在恒温箱(incubator)中进行, 设两个温度, 15  $^{\circ}\text{C}$  和 25  $^{\circ}\text{C}$ , 每个温度用 30 个蚌, 每隔两天用活的有毒微囊藻细胞投喂[15  $^{\circ}\text{C}$ : (15.0  $\pm$  4.33) mg/L DW, 25  $^{\circ}\text{C}$ : (14.5  $\pm$  1.45) mg/L DW], 这样的微囊藻细胞浓度与 Suwa 湖水华期间的水平相似, 给饲养蚌的水族箱充气(即为蚌供给氧气, 也能混合微囊藻细胞), 每隔两天换水一次。分别在第 0、1、3、5、10 和 15 天取蚌解剖得肝胰腺用于 MC 的分析。为了估算投喂给蚌的毒素含量, 从水族箱中取 200 mL 水, 通过 GF/C 滤膜收集, 冷冻干燥, 用 HPLC 法测定毒素。

毒素清除实验: 在上述毒素摄取实验进行到第 15 天时, 将水族箱中的水换上新鲜的脱氯水, 除了不投喂有毒的微囊藻细胞外, 其他与摄取实验条件相同, 分别在第 16、18、20、25 和 30 天取蚌解剖得肝胰腺用于 MC 的分析。

蚌肝胰腺中的毒素用丁醇: 甲醇: 水混合液(butanol: methanol: water solution)(5: 20: 75)反复萃取、离心, 将上清液过 ODS 硅胶柱(octadecylsilane silica gel cartridge)以除去不需要的物质, 再用硅胶柱洗脱。毒素含量用 HPLC 法测定。

每隔两天投喂给蚌的 MC-LR 的含量为(27  $\pm$  4.27)  $\mu\text{g/L}$ (15  $^{\circ}\text{C}$ )和(50  $\pm$  7.52)  $\mu\text{g/L}$ (25  $^{\circ}\text{C}$ )。经过 3 个月的清除, 实验开始时蚌肝胰腺的毒素含量为零(图 5-15)。一开

始投喂有毒微囊藻，蚌的肝胰腺开始迅速积累毒素。大约经过 5 天，肝胰腺对毒素的吸收进入稳定状态： $(130 \pm 11) \mu\text{g/g DW}(15^\circ\text{C})$ 和 $(250 \pm 40) \mu\text{g/g DW}(25^\circ\text{C})$ 。蚌的肝胰腺能积累 MC-LR 高达  $630 \mu\text{g/g DW}$ 。

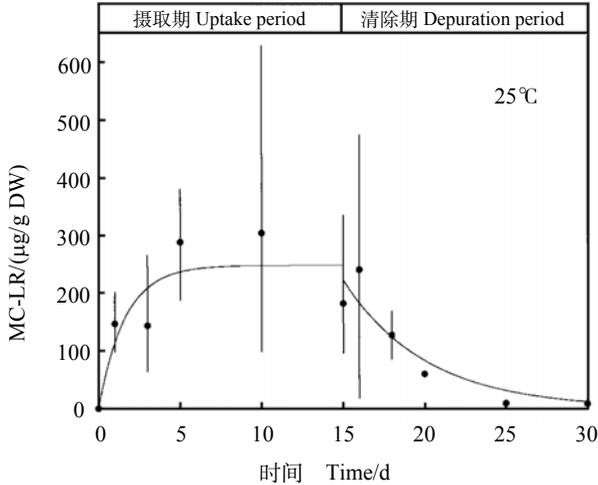


图 5-15 在  $25^\circ\text{C}$  的条件下，圆顶珠蚌肝胰腺对 MC-LR 的富集和清除规律。该蚌在前 15 天摄食有毒微囊藻细胞，然后在后 15 天转为摄食无毒硅藻 (引自 Yokoyama and Park 2003)

实心圆点表示 3 个样品的平均值，垂直线表示组织中 MC-LR 的最小值和最大值

Fig. 5-15 Uptake and depuration of MC-LR in the hepatopancreas of *Unio douglasiae* ingested toxic *Microcystis* cells for the 15-day uptake experiment at  $25^\circ\text{C}$ . In the following 15-day depuration experiment ( $25^\circ\text{C}$ ), bivalves fed nontoxic diatom (Cited from Yokoyama and Park 2003)

Solid circles represent the average of three samples and vertical bars indicate maximum and minimum concentration of MC-LR in the tissue

当蚌被转移到清洁水中时，肝胰腺中的 MC-LR 含量呈渐近线的(asymptotically)模式下降。清除率常数( $k_d$ )为 $(0.142 \pm 0.044)/\text{天}(15^\circ\text{C})$ 和 $(0.226 \pm 0.046)/\text{天}(25^\circ\text{C})$ 。MC-LR 的清除速率在  $25^\circ\text{C}$  显著高于  $15^\circ\text{C}$ ：MC-LR 含量的半衰期在  $25^\circ\text{C}$  条件下为 3.1 天，而在  $15^\circ\text{C}$  条件下则为 4.9 天。经过 15 天的清除期，蚌肝胰腺中的 MC-LR 含量还很高： $17.1 \mu\text{g/g DW}(15^\circ\text{C})$ 和  $8.4 \mu\text{g/g DW}(25^\circ\text{C})$ 。

## 七、斑纹蚌 *Dreissena polymorpha* 对 MC-LR 的摄取和清除规律

荷兰科学家 Pires 等(2004)在实验条件下(水温  $12^\circ\text{C}$ )，研究了斑纹蚌 *Dreissena polymorpha* 对 MC-LR 的摄取和清除规律。斑纹蚌采自 IJsselmeer 湖，将每 20 个斑纹蚌饲养在一个盛有 2 L 用 0.2 m 滤膜过滤过的湖水中，在水族箱充气以保证食物混合。食物分为 3 个处理：① 仅投喂湖沼拟球藻(*Nannochloropsis limnetica*)；② 50：50 的湖沼拟球藻和铜绿微囊藻(基于碳浓度)；③ 仅投喂铜绿微囊藻。每个处理有 3 个重复。铜绿微囊藻为 *Microcystis aeruginosa* strain NIVA-CYA 140，

含 3.1mg MC-LR/g DW。每个水族箱的总食物浓度为 2 mg C/L，水族箱中的水每周换 3 次，摄取实验持续 3 周。之后，对每个处理的蚌仅投喂湖沼拟球藻以研究清除规律，清除持续 3 周。每周从每个水族箱中随机取 5 个蚌，放在用 0.2 μm 滤膜过滤过的湖水中 4 h 以清空肠内含物，这样所测得的 MC-LR 就不包括肠道、鳃和胃中的毒素，仅包括同化的 MC-LR。在 6 周的实验中，均未出现蚌死亡的现象。蚌整体的毒素含量用 LC-MS 测定，平均回收率(average recovery)为(50 ± 4.2)%。此外，还用 MMBP 法，测定了蚌体内共价结合的(covalently bound)MC。

在摄取期，当斑纹蚌仅投喂微囊藻时，体内 MC-LR 的含量经过一周即达到最大值(平均 10.4 μg/g DW)，第 2 周基本维持在这一水平(平均 10.8 μg/g DW)，而在第 3 周却下降到 6.2 μg/g DW；而当斑纹蚌投喂微囊藻和拟球藻的混合食物时，体内 MC-LR 的含量逐步增加(图 5-16)。在清除期，仅投喂微囊藻的蚌在第 1 周体内 MC-LR 含量即大幅下降；而投喂微囊藻和拟球藻的混合食物的蚌，在第 1 周体内 MC-LR 含量基本未变，第 2 周则基本消失。

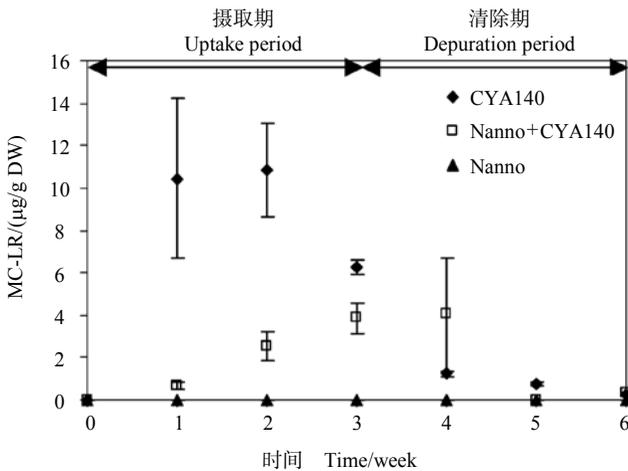


图 5-16 斑纹蚌对 MC-LR 的平均(± S.E.)摄取(第 1~3 周)和清除(第 4~6 周)(μg/g DW)。

涂黑的菱形：仅投喂微囊藻(CYA140)；涂黑的三角形：仅投喂拟球藻(Nanno)；

中空四方形：投喂微囊藻和拟球藻的混合物(Nanno + CYA140)(修改自 Pires et al. 2004)

Fig. 5-16 Mean (± S.E.) uptake (Week 1~3) and depuration (Week 4~6) of microcystin-LR (μg/g DW) for mussels fed solely *Microcystis* (CYA140, black diamond), *Nannochloropsis* (Nanno, black triangle) or a mixture of *Nannochloropsis* and *Microcystis* (Nanno + CYA140, white square) (Modified from Pires et al. 2004)

斑纹蚌摄食微囊藻一周后，其体内共价结合的 MC-LR 仅占总 MC-LR 量的 1%，而经过两周的摄食，则上升到 38.3%(表 5-2)。

以该实验中 MC-LR 含量的最高值(16.3 μg/g DW)为基础，以凤头潜鸭(*Aythya fuligula*)(均重 0.9 kg)为例，其日粮约为 1700 g WW 的蚌组织(约 68 g DW)，则

MC-LR 每天的摄取量为 1231  $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Pires et al. 2004)。假设 MC-LR 的无显见有害效应水平(NOAEL)为 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ (针对小白鼠肝损伤计算而得),口服 MC-LR 的 LD<sub>50</sub> 约为 5000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Fawell et al. 1999), 因此,不太可能会发生凤头潜鸭因摄食斑纹蚌而中毒死亡的现象,但有可能会出现肝损伤;斑背潜鸭(*A. marila*)的情况也基本类似(Pires et al. 2004)。

表 5-2 经过 1~2 周暴露于 MC-LR 后,斑纹蚌体内的 MC-LR 浓度( $\mu\text{g}/\text{g}$  DW)。总 MC-LR 经 MMPB 法处理后用 LC-MS 测定,而游离 MC-LR 经甲醇萃取后用 LC-MS 测定。

总 MC-LR 和游离 MC-LR 之差即为共价结合的 MC-LR

Table 5-2 Concentrations of MC-LR in zebra mussels ( $\mu\text{g}/\text{g}$  DW) after 1 and 2 weeks of exposure to MC-LR. Total MC-LR was determined using the MMPB method. Free MC-LR was determined with a standard MeOH extraction protocol. Both extractions were measured on LC-MS. The difference between total and free MC-LR is given here as covalently bound MC-LR (Cov. MC-LR)

周 Week	总 MC-LR Total MC-LR	自由 MC-LR Free MC-LR	共价结合 MC-LR Cov. MC-LR
1	9.08	8.99	0.09
2	16.3	10.05	6.25

(引自 Pires et al. 2004)(Cited from Pires et al. 2004)

## 八、淡水田螺 *Sinotaia histrica* 对 MC-LR 的摄取和清除规律

日本学者 Ozawa 等(2003)研究了在实验条件下,石田螺 *Sinotaia histrica* 对 MC-LR 的摄取和清除规律。摄取实验使用了 3 个水族箱,每个装有 6 L 脱氯的水,185 个田螺(平均壳长 15.7 mm)分装在这 3 个水族箱中饲养。给水族箱不停地充氧并每天换水。每天给石田螺投喂有毒的微囊藻( $1.0 \times 10^6$  个/mL),共持续 15 天,并迅速移出死亡的个体。实验开始前,取 15 个螺分析其毒素含量(作为对照)。然后,分别在第 1、3、5、10 和 15 天随机取 15 个螺分析毒素含量。在投喂蓝藻 24 h 后,收集水族箱中的水及残余物用于毒素分析和细胞定量。随实验的进展调整水量,保证每个螺有恒定的微囊藻细胞密度。

清除实验在摄取实验结束后进行,将水族箱中的水换为不含微囊藻的去氯水,并用煮熟的生菜投喂螺。然后,分别在第 1、3、5、10 和 15 天随机取 15 个螺分析毒素含量。摄取和清除实验期间的水温为( $19.0 \pm 0.3$ )  $^{\circ}\text{C}$ 。

在摄取实验期间,摄食后不久,螺很快排出了含微囊藻细胞的粪便。螺接触的藻毒素的平均含量为( $20.1 \pm 6.1$ )  $\mu\text{g}/\text{L}$ ,螺对 MC-LR 的摄食率为每天 1.48(0.42~2.65)  $\mu\text{g}/\text{ind}$ (图 5-17)。在向螺投喂微囊藻细胞前,未能在螺肝胰腺中检测到有毒素含量,摄取实验开始后,螺肝胰腺中的毒素含量迅速上升,在第 10 天达到最高值(436  $\mu\text{g}/\text{g}$  DW)。随着摄取实验的结束即停止投喂微囊藻,螺肝胰腺

中的 MC-LR 含量在最初的 5 天大致保持了恒定(图 5-18), 此后, MC-LR 含量缓慢下降, 至实验结束时仍然保持了较高的含量(127  $\mu\text{g/g DW}$ )。

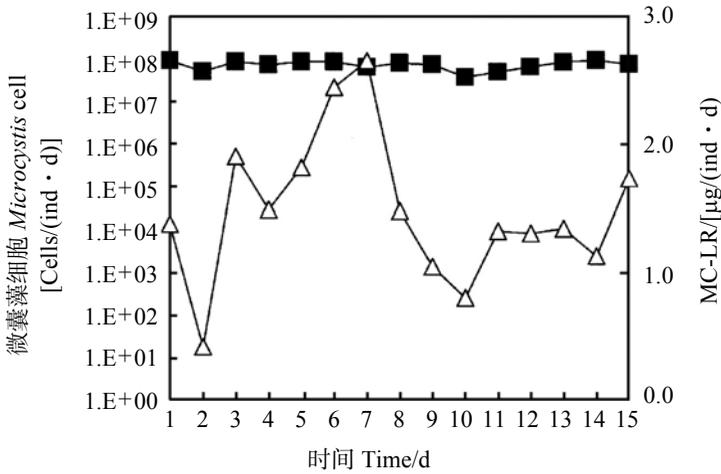


图 5-17 摄取期田螺对 *Microcystis ichthyoblabe* 细胞(■)及 MC-LR (△)的日摄食率(引自 Ozawa et al. 2003)

Fig. 5-17 Daily uptake rates of *Microcystis ichthyoblabe* cells (■) and MC-LR (△) during the uptake period by the snail (Cited from Ozawa et al. 2003)

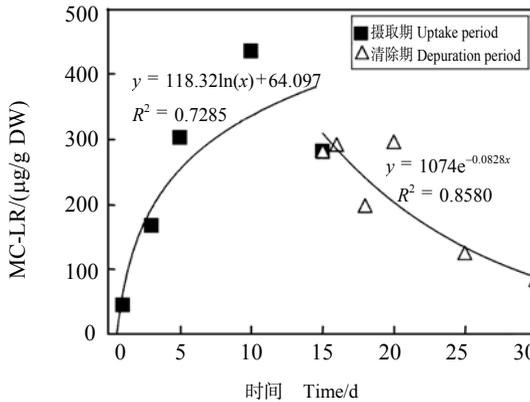


图 5-18 在摄取和清除期间, 田螺肝胰腺中 MC-LR 浓度的变化。第 0 天未检测到 MC-LR, DW 为干重(引自 Ozawa et al. 2003)

Fig. 5-18 Changes of MC-LR concentration in the hepatopancreas of the snail during the uptake and depuration experiment. MC-LR was not detected on day 0. DW, dry weight (Cited from Ozawa et al. 2003)

在清除实验的第 3 天至第 5 天, 石田螺肝胰腺中的毒素含量有一个明显的上升。其他学者也报道了在软体动物体内有类似的现象(Vasconcelos 1995, Amorim and Vasconcelos 1999)。

Ozawa 等(2003)引述 Yokoyama 和 Park 的未发表资料, 1999 年在蓝藻水华发生前的 5 个月, 石田螺肝胰腺中的毒素含量达到 10.1  $\mu\text{g/g DW}$ , 他们推测这可能是秋冬季螺体内积累下来的微囊藻毒素。因此, 螺体内的毒素能保持数月。

## 九、不同实验研究中软体动物体内最大 MC 含量的比较

在实验条件下, 软体动物体内的 MC(甲醇可萃取)可以达到惊人的含量(表 5-3), 如圆顶珠蚌肝胰腺中的 MC-LR 含量可达 630  $\mu\text{g/g DW}$ (25  $^{\circ}\text{C}$ , 所投喂的微囊藻 *Microcystis ichthyoblabe* TAC95 的毒素 MC-LR 含量高达 13.7  $\text{mg/g DW}$ ) (Yokoyama et al. 2003), 田螺 *Sinotaia histrica* 肝胰腺中的含量可达 436  $\mu\text{g/g DW}$  (19  $^{\circ}\text{C}$ ) (Ozawa et al. 2003)。在 Yokoyama 等(2003)的实验中, 一共使用了 60 个圆顶珠蚌, 仅有一个蚌死亡(出现在第 23 天, 15  $^{\circ}\text{C}$ ), 而圆顶珠蚌肝胰腺中 MC-LR 的稳定浓度高达 130  $\mu\text{g/g DW}$  (15  $^{\circ}\text{C}$ )和 250  $\mu\text{g/g DW}$ (25  $^{\circ}\text{C}$ ), 表明圆顶珠蚌对 MC-LR 具有极强的耐受能力。

表 5-3 室内实验中软体动物体内的毒素含量

Table 5-3 A comparison of MC contents in mollusks in laboratory experiment

种类 Species	器官 Organ	毒素 Toxin	最大浓度 Max. concentration	分析方法 Analysis Method	文献 References
<b>双壳纲(Bivalvia)</b>					
一种贻贝 <i>Mytilus edulis</i>	Whole	MC	0.204 $\mu\text{g/g WW}$	PPIA	Williams et al. 1997b
	Whole	MC	336.9 $\mu\text{g/g WW}$	Lemieux Oxidation GC/MS	Williams et al. 1997b
紫贻贝 <i>M. galloprovincialis</i>	Whole	MC-LR	10.5 $\mu\text{g/g DW}$	HPLC-UV	Vasconcelos 1995
	Digestive tract	MC-LR	27.6 $\mu\text{g/g DW}$	HPLC-UV	Vasconcelos 1995
	Whole	MC	16 $\mu\text{g/g DW}$	ELISA	Amorim and Vasconcelos 1999
一种无齿蚌 <i>Anodonta cygnea</i>	Whole	MC	30 $\mu\text{g/g DW}$	HPLC	Lindholm et al. 1989
	Whole	MC	70 $\mu\text{g/g DW}$	HPLC-UV	Eriksson et al. 1989
	Hepatopancreas	MC	136 $\mu\text{g/g DW}$	HPLC-UV	Eriksson et al. 1989
一种无齿蚌 <i>Anodonta grandis simpsoniana</i>	Whole	MC	1.35 $\mu\text{g/g WW}$	PPIA	Prespas et al. 1997
圆顶珠蚌 <i>Unio douglasiae</i>	Hepatopancreas	MC-LR	630 $\mu\text{g/g DW}$	HPLC-PDA	Yokoyama et al. 2003
斑纹蚌 <i>Dreissena polymorpha</i>	Whole	MC-LR	11 $\mu\text{g/g DW}$	LC-MS	Pires et al. 2004
<b>腹足纲 Gastropoda</b>					
石田螺 <i>Sinotaia histrica</i>	Hepatopancreas	MC-LR	436 $\mu\text{g/g DW}$	HPLC-PDA	Ozawa et al. 2003

DW: 干重 dry weight; WW: 湿重 wet weight; whole: 整体; digestive tract: 消化道; hepatopancreas: 肝胰腺

## 第六章 自然水体中 MC 在软体动物体内的生物累积

关于自然水体中生活的软体动物体内 MC 含量的研究绝大多数来自淡水水体, 偶有针对海洋环境的, 研究区域包括亚洲、北美洲和欧洲的水体。有意思的是, 关于自然水体中软体动物体内 MC 存在的首次报道见于海洋蚌类(Chen et al. 1993), 而在淡水水体中, Watanabe 等(1997)关于日本 Suwa 湖中蚌体内存在 MC 的报道为首次。

### 一、海洋蚌体内 MC 存在的首次报道

Chen 等(1993)首次确定了采自海洋的蚌组织中 MC-LR 的存在。蚌样采自加拿大东北太平洋海域的 Gillam 岛。他们在用蛋白磷酸酶活性抑制法检测海蚌是否含腹泻性贝毒素(diarrhetic shellfish toxin, DSP)时发现存在某种活性物质, 按大田软海绵酸 OA 单位计算其毒性, 比被接受的日本检疫标准(quarantine standard)高出 4 倍。通过液相色谱与 PPase 联用的初步特征分析, 排除了为已知腹泻性贝毒素(如大田软海绵酸 OA)的可能, 而确认了与淡水中的 MC 具有相似的色谱特征的一种蛋白磷酸酶活性抑制物质的存在。通过对蚌甲醇萃取物(methanolic mussel extract)的色谱分离, 得到准确地同 MC-LR 一起移动的活性物质[图 6-1 的(A)和(B)], 通过毛细管电泳(capillary electrophoresis, CE)确认该抑制剂就是 MC-LR[图 6-1 的(C)~(E)], 质谱分析表明该毒素峰的  $[M+H]^+$  为  $(995.9 \pm 1)$  Da, 与 MC-LR 的  $[M+H]^+$  (995.6 Da) 十分吻合[图 6-1 的(F)]。蚌组织中的毒素 MC-LR 含量为 600 ng/g。通过 LC 和 PPase 联用的方法, 他们还发现加拿大的 Prince Edward 岛养殖的蚌体内含 MC-LR(进一步通过 CE 确认 MC-LR 的存在), 含量为 2 ng/g。

Chen 等(1993)认为, 在海洋和沿海有壳类中发现的致癌性 MC 确认了一类新的潜在地能引起有壳类中毒的毒素的存在, 按习惯可称为有壳类肝中毒(Hepatotoxic shellfish poisoning, HSP), 而 HSP 的检疫标准应显著低于 DSP, 因为 MC-LR 的  $LD_{50}$  (50  $\mu$ g/kg, i.p. in mice) 仅为 OA 的 1/4。Hashimoto(1979)曾报道了人们因食用有毒的蚌而发生肝中毒的事件十分广泛, 并认为是由一种被称为“venerupin”的物质所引起的; 由于并没有从化学上确定该化合物的结构, Chen 等(1993)认为可能与 MC 有关。在 Chen 等(1993)的研究中, 虽然没有确认产生 MC 的生物是什么, 但他们认为可能是海洋原核生物(marine prokaryote)。

Chen 等(1993)的论文是最早也是迄今为止唯一一篇报道了在天然海域采集到的软体动物体内发现有 MC 存在的论文。

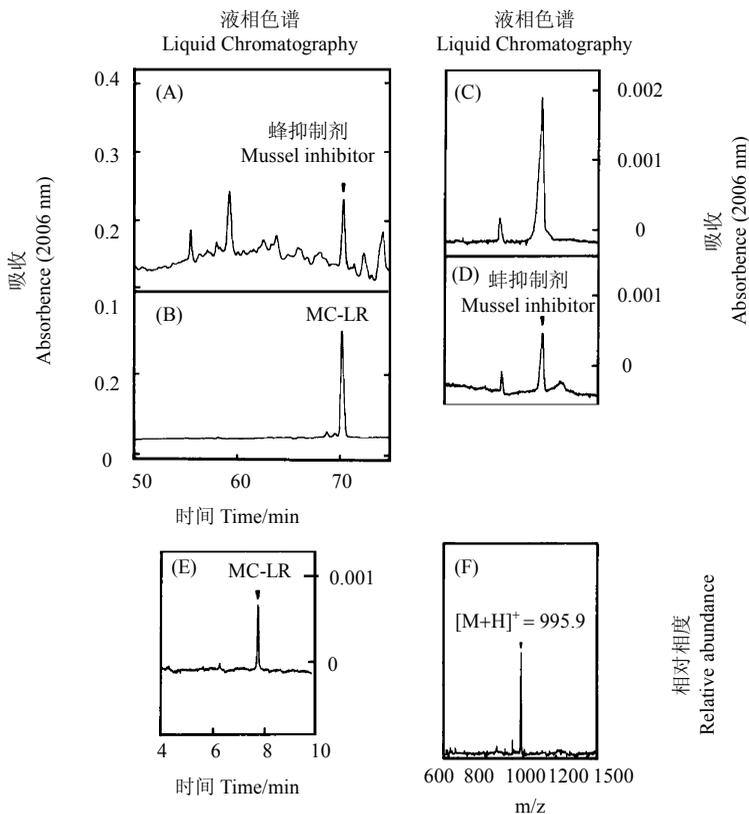


图 6-1 太平洋东北海域蚌体内的 MC-LR 的纯化与特征 (引自 Chen et al. 1993)

图(A)和(B)表示用蛋白磷酸酶(PPase)抑制剂测定法与用液相色谱法联用的 PP-1c 生物测定法(用 Vydac C<sub>18</sub> 柱, 检测波长为 206 nm)测定的 MC-LR 的色谱图无明显差异; 图(C)~(E)表示从图(A)中具活性的液相部分通过毛细管电泳(CE)而获得的 MC-LR 进行的光学检测结果及其分辨率; 蚌蛋白磷酸酶抑制剂[图(D)]在洗脱过程中与 MC-LR 具有同样的保留时间[图(E)]及与 MC-LR 为同一物质的事实通过一已知数量(1.6 ng)的 MC-LR 标准物的尖峰[图(C)]得以确认; 图(F)为从蚌体内纯化的 MC-LR 的质谱分析图

Fig. 6-1 Purification and characterization of MC-LR from Northeastern Pacific Ocean mussels(Cited from Chen et al. 1993)

Panels (A) and (B) represent the detection of a PPase inhibitor chromatographically indistinct from MC-LR by LC-linked PP-1c bioassay employing a Vydac C<sub>18</sub> column with detection at 206 nm. Panels (C)~(E) represent optical detection and resolution of MC-LR from the active LC fraction in panel (A) by capillary electrophoresis (CE). The mussel PPase inhibitor [panel (D)] eluted at the same retention time as MC-LR [panel (E)] and its identity as this toxin was confirmed by spiking with a defined amount (1.6 ng) of MC-LR standard [panel (C)]. Panel (F) represents mass spectrometric analysis of MC-LR purified from the mussels; CE detection was at 200 nm

## 二、淡水蚌体中 MC 存在的首次报道

淡水蚌类在日本的淡水湖泊中虽广泛存在, 但很少被人们所消费。日本的

Suwa 湖每年夏季都有严重的蓝藻水华发生, Watanabe 等(1997)对该湖中蚌体内是否累积有 MC 进行了研究。所研究的 3 种蚌均为蚌科(Unionidae)的种类, 分别是珠蚌亚科(Unionidae)的圆顶珠蚌 *Unio douglasiae*、无齿蚌亚科 Anodontinae 的背角无齿蚌 *Anodonta woodiana* 和褶纹冠蚌 *Cristaria plicata*, 它们不仅是日本淡水水体中的常见种类, 在我国也有广泛分布。在我国, 这些蚌类可供人食用, 肉及壳粉可作为家畜和家禽的饲料, 也是底栖肉食性鱼类、禽类的天然饵料(齐钟彦 1996)。

通过 Frit-FAB LC/MS 确认圆顶珠蚌肝胰腺中 MC-RR(图 6-2 中的峰 A)和 MC-LR(图 6-2 中的峰 B)的存在, 以及背角无齿蚌肝胰腺中 MC-RR 的存在(图 6-3 中的峰 A)。如果在用 ODS 柱进行第 1 次净化的基础上, 再用硅胶柱进行第 2 次净化, HPLC 色谱图上的峰 A 就会更加清楚(图 6-3)。

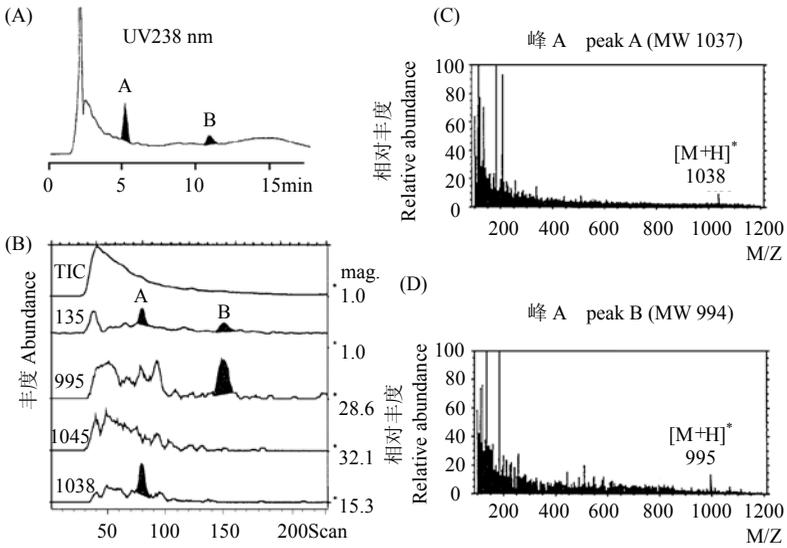


图 6-2 圆顶珠蚌肝胰腺的色谱图 (引自 Watanabe et al. 1997)

(A) 在 238 nm 波长检测的 HPLC 色谱图; (B) 总离子流图和质荷比为 135、995、1045 和 1038 的离子流图; (C) 峰 A 的 Frit-FAB (快原子轰击)质谱图; (D) 峰 B 的 Frit-FAB 质谱图

Fig. 6-2 Chromatograms measured for a hepatopancreas of *Unio douglasiae* (Cited from Watanabe et al. 1997)

(A) High performance liquid chromatogram monitored at 238 nm; (B) Total ion chromatogram and mass chromatograms monitored at  $m/z$  135, 995, 1045 and 1038; (C) Frit-FAB LC/MS mass spectrum of peak A; (D) Frit-FAB LC/MS mass spectrum of peak B

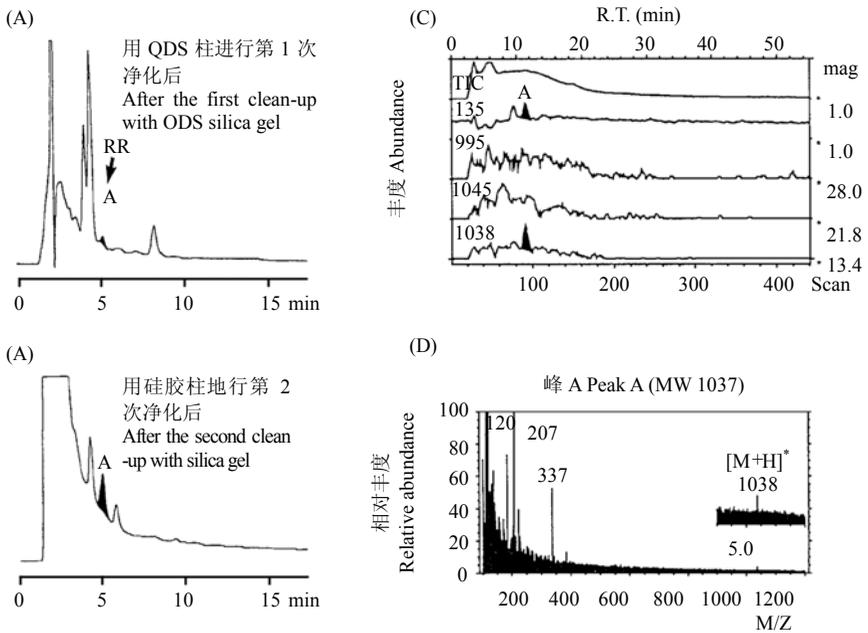


图 6-3 背角无齿蚌肝胰腺的色谱图 (引自 Watanabei et al. 1997)

(A) 先过 ODS 硅胶柱后在 238 nm 波长检测的 HPLC 离子流图; (B) 再过硅胶柱后的 HPLC 色谱图; (C) 总离子流图和峰 A 在质荷比为 135、995、1045 和 1038 的质谱图; (D) 峰 A 的 Frit-FAB 质谱图

Fig. 6-3 Chromatograms measured for a hepatopancreas of *Anodonta woodiana* (Cited from Watanabei et al. 1997)

(A) High performance liquid chromatogram monitored at 238 nm after the first clean-up with ODS silica gel. (B) HPLC chromatogram after the second clean-up with silica-gel. (C) Total ion chromatogram and mass chromatograms of Peak A monitored at  $m/z$  135, 995, 1045 and 1038. (D) Frit-FAB LC/MS mass chromatogram of peak A

从 MC 在圆顶珠蚌各器官的分布情况来看, 肝胰腺中的含量最高, 其次为鳃和肌肉, 在性腺和消化管中含量较低(表 6-1)。在背角无齿蚌的肝胰腺中, 仅检测到 MC-RR, 而在褶纹冠蚌的肝胰腺中未检测到 MC。圆顶珠蚌和背角无齿蚌是日本淡水水体中常见的优势蚌类, 偶尔也被湖边的居民所消费。

表 6-1 1992 年从 Suwa 湖采集到的 3 种蚌器官中的两种微囊藻毒素(MC-RR 和 MC-LR)的含量

Table 6-1 MC concentration in mussels collected from Lake Suwa in 1992

种类 Species	日期 Date	器官 Organ	MC/( $\mu\text{g/g}$ )	
			MC-RR	MC-LR
圆顶珠蚌 <i>Unio douglasiae</i>	7 月 22 日 July 22	肝胰腺 Hepatopancreas	1.73	0.99
		鳃和肌肉 Gill and muscle	1.29	0.71
		性腺 Gonad	0.79	0.40
		肠道 Gut	0.79	0.52
		背角无齿蚌 <i>Anodonta woodiana</i>	8 月 8 日 August 8	肝胰腺 Hepatopancreas
褶纹冠蚌 <i>Cristaria plicata</i>	9 月 19 日 July 19	肝胰腺 Hepatopancreas	ND	ND

ND: 无数据 no data (引自 Watanabe et al. 1997)(Cited from Watanabe et al. 1997)

Watanabe 等(1997)的论文是对从自然水体中采集到的淡水蛙类器官中有 MC 存在的首次报道。

### 三、日本 Suwa 湖中 3 种蛙肝胰腺中 MC 的季节变动规律

Yokoyama 和 Park(2002)研究了日本本州中部的浅水超富营养型湖泊 Suwa 湖中 3 种蛙肝胰腺中 MC 的季节变动规律。Suwa 湖自 20 世纪 70 年代以来每年夏季发生严重的蓝藻水华,水华蓝藻产 MC-RR 和 MC-LR。调查地点是该湖南岸水深约 1 m 的沿岸带,调查于 1997 年(每月采集一次)和 1998 年(每两月采集一次)进行。采集到 3 种蛙:背角无齿蛙 *Anodonta woodiana*、褶纹冠蛙 *Cristaria plicata* 和圆顶珠蚌 *Unio douglasiae*。取肝胰腺用于毒素分析。悬浮物(seston)中的 MC 也称胞内 (intracellular)MC, 溶解性 MC 也称胞外(extracellular)MC。胞内、胞外以及蛙类肝胰腺的 MC 的测定用 HPLC 法。

根据 1998 年的调查,胞外的 MC 远低于胞内 MC, 只占两者之和的不足 2%, 胞外 MC 的最大值为 0.211  $\mu\text{g/L}$ (图 6-4)。

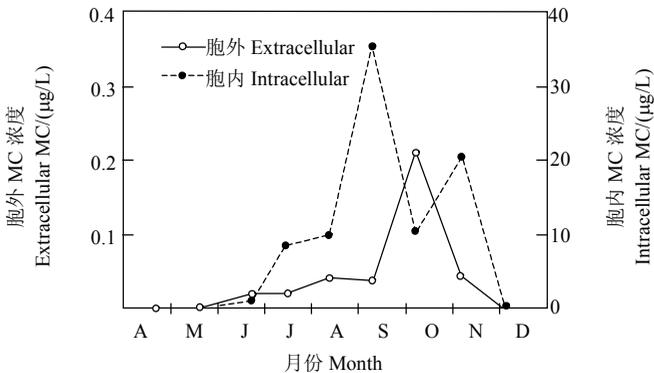


图 6-4 Suwa 湖表层水中胞内和胞外 MC 含量的季节变化(1998 年 4~12 月)

(引自 Yokoyama and Park 2002)

Fig. 6-4 Seasonal changes in extra- and intracellular MC concentrations in surface water of Lake Suwa from April to December 1998 (Cited from Yokoyama and Park 2002)

3 种蛙的肝胰腺均有 MC 的积累, 但有较大的种间差异: 背角无齿蛙肝胰腺内的 MC 含量总是低于褶纹冠蛙和圆顶珠蚌, 3 个种类的 MC 含量的最大值分别为 12.6  $\mu\text{g/g}$ 、297  $\mu\text{g/g}$  和 420  $\mu\text{g/g}$ (图 6-5)。关于肝胰腺内的 MC-LR 与总 MC 之比(平均值 $\pm$ SD), 背角无齿蛙为(9.8 $\pm$ 19.8)%、褶纹冠蛙为(8.9 $\pm$ 10.1)%, 远低于圆顶珠蚌的(38.6 $\pm$ 17.4)%。从图 6-6 可以看出, 圆顶珠蚌对 MC 的积累达到食物中 MC 含量的 28%。3 种蛙体内的 MC-LR/MC 的比例的平均值有所差异, 但是它们都有偏向累积 MC-RR 的趋势, 因为其体内的 MC-RR/MC 比高于 SS, 特别是背角无

齿蚌和褶纹冠蚌体内的 MC-RR/MC 高达 90%。

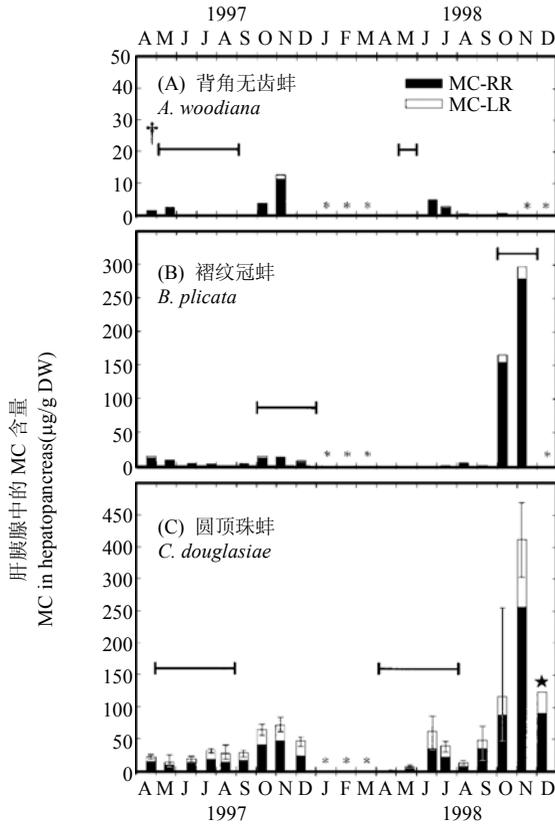


图 6-5 琵琶湖背角无齿蚌(A)、褶纹冠蚌(B)和圆顶珠蚌(C)肝胰腺中 MC 浓度的季节变化(引自 Yokoyama and Park 2002)

圆顶珠蚌的数据为平均值。\*未检测；†在外鳃板的孵育室出现卵和钩介幼虫的时期；★为 1998 年 12 月 3 日所采一个样品的测定值，框图(C)中的竖线表示根据 2 或 3 个样品所测得的总 MC(MC-RR+MC-LR)含量的范围

Fig. 6-5 Seasonal changes of MC concentration in the hepatopancreas of (A) *Anodonta woodiana*, (B) *Cristaria plicata*, and (C) *Unio douglasiae* from Lake Suwa (Cited from Yokoyama and Park 2002)

Data of *U. douglasiae* show mean values. \* not determined; †the period during which eggs or glochidia were observed in brood chambers of the outer gill lamella; ★the value derives from one sample taken on December 3, 1998. Vertical bars in panel (C) represent the rang of total MC (MC-RR and MC-LR) concentrations in two or three samples

圆顶珠蚌肝胰腺中的 MC 含量与 SS 中的 MC(µg/g)含量有很好的相关性 ( $R^2=0.72$ )(图 6-6)，而当 SS 中的 MC 含量用 µg/L 表示时，相关系数  $R^2=0.15$ ，与溶解在湖水中的 MC 含量(µg/L)的相关系数  $R^2=0.01$ 。

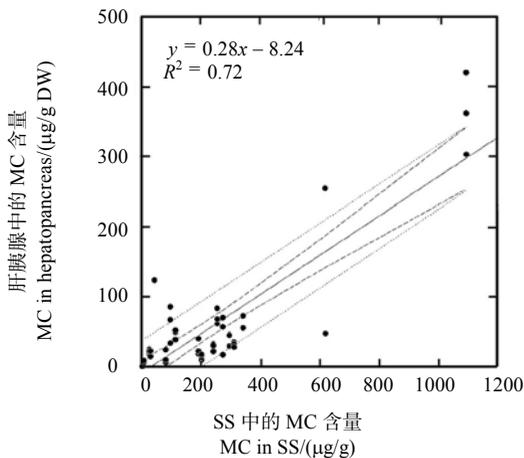


图 6-6 在 1997~1998 年期间，圆顶珠蚌肝胰腺中的 MC 含量与悬浮物中的 MC 含量的线性回归关系(引自 Yokoyama and Park 2002)

实线为所有数据的回归线，虚线和点线分别表示回归关系的 95% 的置信限及预测值的标准偏差

Fig. 6-6 Linear regression between MC in the hepatopancreas of *Unio douglasiae* versus MC in SS during 1997~1998(Cited from Yokoyama and Park 2002)

A solid line is a regression line for all the data; dashed and dotted lines indicate 95% confidence limits for the regression and standard errors for the predicted values, respectively

Yokoyama 和 Park(2002)认为，仅仅根据 SS 的毒素含量来预测蚌肝胰腺中 MC 的生物累积是不够的，例如，MC 在秋天可能更易累积，因为毒素的净化率系数(depuration rate coefficient,  $k_d$ )随水温的下降而降低，这样，由于冬天的  $k_d$  较低，组织中的 MC 不易被清除而将残留至春天，也就是说，早春蚌肝胰腺中的 MC 有可能是上一年积累留下来的。另一种可能是，早春是一些蚌(如圆顶珠蚌)的繁殖季节，因而摄食率增加，从而可能增加 MC 的积累。

#### 四、中国太湖 4 种蚌类各种器官中 MC 含量的变化

Chen 和 Xie(2005)于 2003 年 10 月至 2004 年 9 月研究了太湖梅梁湾中 4 种淡水蚌(背角无齿蚌、背瘤丽蚌、三角帆蚌和褶纹冠蚌)(图 6-7)体内各种器官(肝胰腺、肠道、内脏团、鳃、足和其他)中的 3 种 MC(MC-LR、MC-YR 和 MC-RR)的季节变化。MC 的定性和定量分别用 LC/MS 和 HPLC-UV。太湖梅梁湾每年夏季都发生严重的有毒蓝藻水华。4 种蚌的体长、体重、 $\delta^{13}\text{C}$  和  $\delta^{15}\text{N}$  值以及自然分布见表 6-2，其中三角帆蚌为我国的特有种。在太湖流域，蚌类是重要的食用水产品。

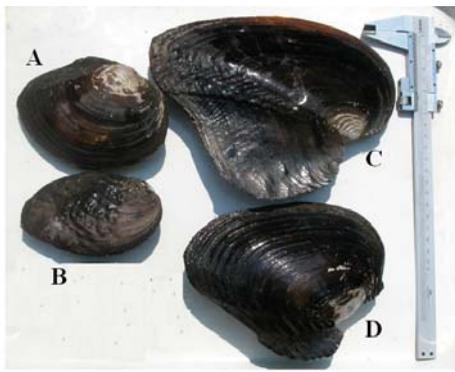


图 6-7 采自太湖梅梁湾的 4 种蚌图片 (引自 Chen and Xie 2005b)

(A) 背角无齿蚌; (B) 背瘤丽蚌; (C) 三角帆蚌; (D) 皱纹冠蚌

Fig. 6-7 Photo of four bivalves collected from Meiliang Bay of Lake Taihu (Cited from Chen and Xie 2005b)

(A) *Anodonta woodiana*; (B) *Lamprotula leai*; (C) *Hyriopsis cumingii*; (D) *Cristaria plicata*

表 6-2 太湖梅梁湾 4 种蚌的体长(BL)、体重(BW)、足样品的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值 (8 月)以及自然分布

Table 6-2 Body length (BL), body weight (BW),  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  of the feet (in August) of the four bivalves collected from Meiliang Bay of Lake Taihu

种类 Species	体长 BL/mm	体重 BW/g	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	自然分布 Natural range
背角无齿蚌 <i>A. woodiana</i>	130±8.4	77.4±13.9	-29.84	4.48	中国、前苏联、日本和韩国 China, USSR, Japan and Korea
背瘤丽蚌 <i>L. leai</i>	100±6.5	59.6±7.3	-27.01	9.81	中国和越南 China and Vietnam
三角帆蚌 <i>H. cumingii</i>	190±12.4	89.3±12.5	-29.21	5.87	中国特有种 Endemic to China
皱纹冠蚌 <i>C. plicata</i>	240±13.5	114.9±27.8	-24.7	12.6	中国、前苏联、日本和韩国 China, USSR, Japan and Korea

(引自 Chen and Xie 2005b)(Cited from Chen and Xie 2005b)

在研究期间,所有蚌体内各器官中的 MC 含量的季节变化很大(图 6-8),而肝胰腺和肠道均在 7 月或 8 月出现明显的高峰值。在肝胰腺、肠道、内脏团、鳃、足和其他器官中的最高 MC 含量分别为 38.48、20.65、1.7、0.64、0.58 和 0.61  $\mu\text{g/g}$  DW(表 6-3)。毒素主要分布在肝胰腺中(45.5%~55.4%),其次为包含有相当数量的性腺的内脏团(27.6%~35.6%),而鳃和足中的含量最低(1.8%~5.1%)。4 种蚌的肠道和肝胰腺中的 MC 含量之间具有显著的正相关性( $r=0.75\sim 0.97, P<0.05$ )。此外,肝胰腺中 MC 的最大值与足的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 之间均具有正的相关性( $r$ 值分别为 0.919 和 0.878),表明肝胰腺中的不同的 MC 含量可能与摄取的食物不同有关。

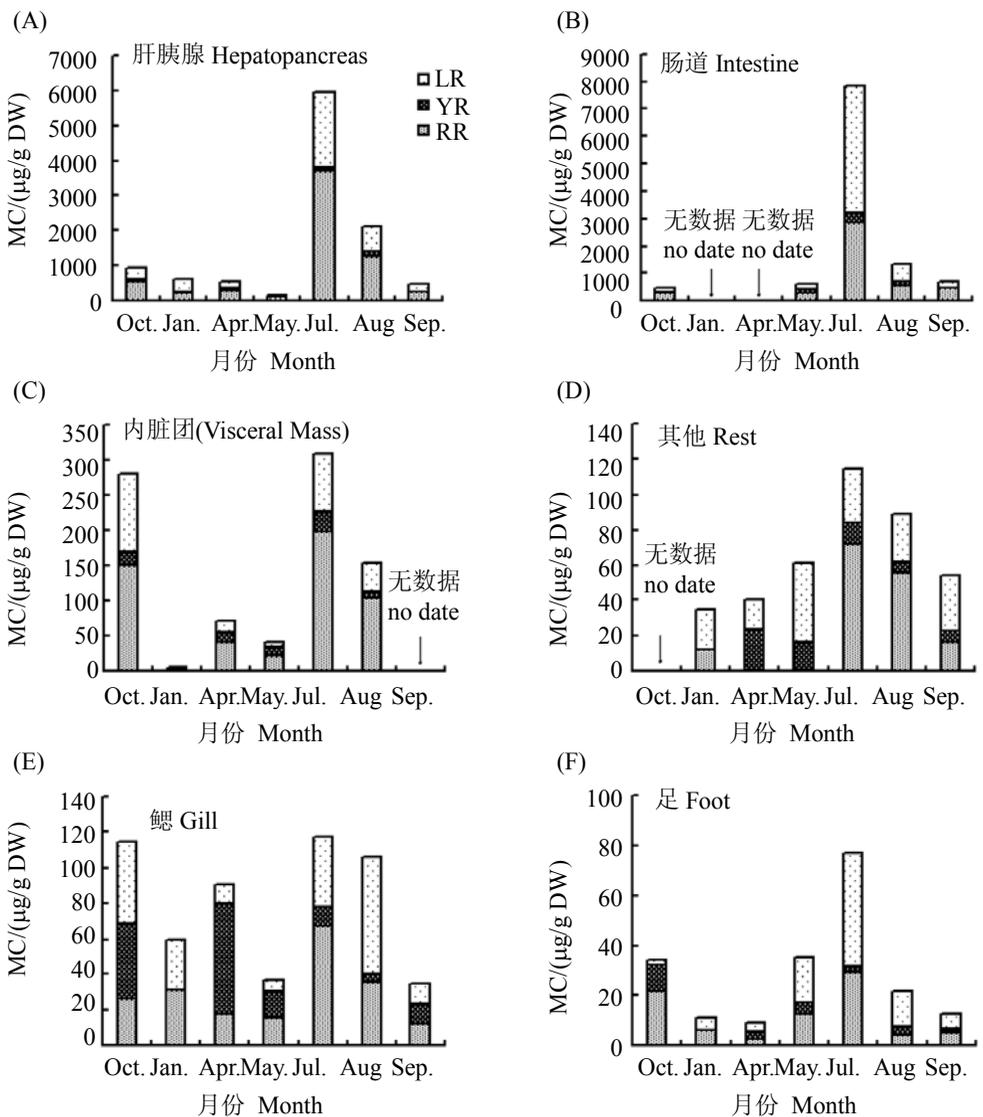


图 6-8 背角无齿蚌(A)肝胰腺、(B)肠道、(C)内脏团、(D)其他、(E)鳃和(F)足中 MC-LR、MC-YR 和 MC-RR 浓度的季节变化(引自 Chen and Xie 2005b)

Fig. 6-8 The seasonal changes of MC-LR, MC-YR, and MC-RR concentrations (ng/g DW) in (A) hepatopancreas, (B) intestine, (C) viscera mass, (D) rest, (E) gill and (F) foot of *Anodonta woodiana* (Cited from Chen and Xie 2005b)

取蚌的干湿比为 0.2, 因小白鼠腹腔注射 MC-RR、MC-YR 的  $LD_{50}$  分别比 MC-LR 高 5 倍和 2.5 倍(Gupta et al. 2003), 分别将 MC-RR 和 MC-YR 乘以 0.2 和 0.4 转换成 MC-LReq, 再假定成年人的平均体重为 60 kg, 每人每天平均摄食 300 g 鲜重的蚌肉(足), 则所分析的 28 个蚌足样品中, 有 15 个(54%)超过 WHO 建议

的 TDI 值(每天 0.04  $\mu\text{g MC-LR/kg BW}$ )。当地居民对蚌的消费几乎利用所有蚌组织(包括 MC 含量很高的肝胰腺), 而通常只是在食用前对蚌进行短期暂养(以排除肠含物)。在该研究期间, 4 种蚌整体的平均 MC 含量为 0.064~0.188  $\mu\text{g MC-LReq/g WW}$ , 比 WHO 建议的 TDI 高 8~23.5 倍(如果这些蚌作为整体被食用的话)! 因此, 食用太湖梅梁湾的蚌类对人类健康具有极高的危险性!

表 6-3 2003 年 10 月至 2004 年 9 月期间, 从太湖梅梁湾采集到的 4 种蚌各器官干重占总体重的百分比、各器官中的毒素含量及百分比

Table 6-3 Dry weight of the different bivalve organs as a percentage of total weight, MC contents and percentage of toxins present in the different organs of four freshwater bivalves collected from Meiliang Bay of Lake Taihu during Oct. 2003 and Sep. 2004

种类 Species	组织 Tissue	干重 DW/%	平均 MC Mean MC/ $\mu\text{g/g}$	毒素 <sup>a</sup> Toxin <sup>a</sup> /%	毒素 <sup>b</sup> Toxin <sup>b</sup> /%
背角无齿蚌 <i>A. woodiana</i>	肠道 Intestine	2.2	2.17 (0.42~7.88) <sup>c</sup>	22.1	
	肝胰腺 Hepatopancreas	5.1	1.54 (0.15~5.96)	35.5	45.5
	内脏团 Visceral mass <sup>d</sup>	40.2	0.14 (0.007~0.31)	25.7	32.9
	鳃 Gill	9.5	0.08 (0.034~0.12)	3.5	4.4
	足 Foot	12.1	0.072 (0.024~0.19)	4.0	5.1
	其他 Rest	31.1	0.066 (0.035~0.11)	9.4	12.0
	三角帆蚌 <i>H. cumingii</i>	肠道 Intestine	3.7	3.83 (0.035~20.65)	21.7
肝胰腺 Hepatopancreas		8.3	3.42 (0.076~12.50)	43.4	55.4
内脏团 Visceral mass <sup>d</sup>		45.3	0.31 (0.052~0.80)	21.6	27.6
鳃 Gill		9.1	0.10 (0.022~0.23)	1.4	1.8
足 Foot		10.0	0.21 (0.015~0.58)	3.2	4.1
其他 Rest		23.6	0.24 (0.052~0.49)	8.7	11.1
褶纹冠蚌 <i>C. plicata</i>		肠道 Intestine	5.7	1.68 (0.069~5.64)	23.5
	肝胰腺 Hepatopancreas	2.9	5.79 (0.16~38.48)	41.2	53.9
	内脏团 Visceral mass <sup>d</sup>	58.0	0.19 (0.017~0.71)	27.2	35.5
	鳃 Gill	6.6	0.093 (0.035~0.22)	1.5	2.0
	足 Foot	7.0	0.11 (0.033~0.23)	1.9	2.5
	其他 Rest	19.8	0.096 (0.037~0.22)	4.7	6.1
	背瘤丽蚌 <i>L. leai</i>	肠道 Intestine	1.6	0.93 (0.18~2.53)	2.8
肝胰腺 Hepatopancreas		6.1	4.25 (0.38~13.23)	47.4	48.8

种类 Species	组织 Tissue	干重 DW/%	平均 MC Mean MC/ $\mu\text{g/g}$	毒素 <sup>a</sup> Toxin <sup>a</sup> /%	毒素 <sup>b</sup> Toxin <sup>b</sup> /%
	内脏团 Visceral mass <sup>d</sup>	45.2	0.41 (0.037~1.70)	34	35.0
	鳃 Gill	7.8	0.22 (0.004~0.64)	3.1	3.2
	足 Foot	9.9	0.19 (0.021~0.52)	3.4	3.5
	其他 Rest	29.5	0.17 (0.043~0.61)	9.2	9.5

a 包括肠道 Including intestines; b 不包括肠道 Excluding intestines; c 括号中的数据表示范围 Values in parentheses indicates range; d 不包括肝胰腺和肠道 Excluding hepatopancrea and intestine

(引自 Chen and Xie 2005b)(Cited from Chen and Xie 2005b)

## 五、荷兰 IJsselmeer 湖斑纹蚌体内的 MC 含量的季节变化

Ibelings 等(2005)研究了荷兰的大型浅水湖泊 IJsselmeer 湖斑纹蚌(*Dreissena*)体内 MC 含量的季节变化。该湖中浮游植物为主要的初级生产者, 初级生产量的 1/3 被斑纹蚌所摄食。斑纹蚌用网采集, 并用刷子仔细清洗, 将样品冷冻干燥、粉碎及萃取后, 用 HPLC 测定 MC 的含量。在所分析的斑纹蚌样品中, 89%检测出 MC, 平均 MC 含量(图 6-9)在 2~12  $\mu\text{g/g}$  AFDW 变动(因蚌的灰分含量低, 以干重(DW)来算 MC 的含量范围也相同)。而在几乎所有颗粒悬浮物 SS 中均检测出 MC, SS 中的 MC 含量范围为 0~3600  $\mu\text{g/g}$  AFDW(0~2400  $\mu\text{g/g}$  DW), 而同样是滤食浮游植物的浮游动物体内的 MC 含量范围为 63~211  $\mu\text{g/g}$  AFDW(57~192  $\mu\text{g/g}$  DW), 远高于斑纹蚌。他们推测, 斑纹蚌体内 MC 含量较低的原因之一可能是它们能选择性地排除有毒蓝藻。

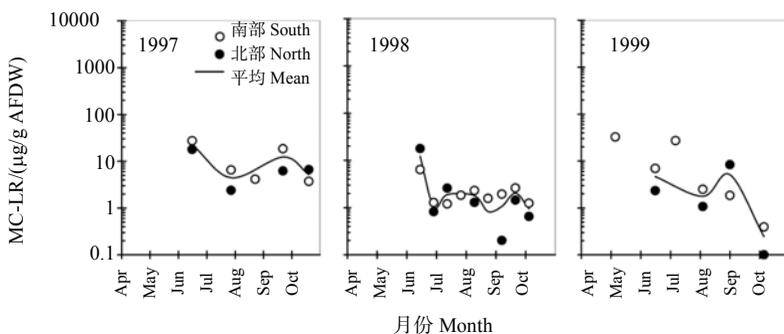


图 6-9 荷兰 IJsselmeer 湖的南部(空心圆圈)和北部(实心圆圈)连续 3 年(1997~1999)夏季斑纹蚌体内的 MC 含量, 连线表示全湖平均(引自 Ibelings et al. 2005)

Fig. 6-9 Concentration of MC in *Dreissena* during three consecutive summers (1997~1999) in the southern (open symbols) and northern (closed symbols) part of Lake IJsselmeer, Netherlands. The line indicates the average for the whole lake (Cited from Ibelings et al. 2005)

## 六、加拿大湖泊营养水平对 3 种螺类组织中 MC 含量的影响

Zurawell 等(1999)通过野外调查的方法,研究了湖泊的营养状态对肺螺体内 MC 含量的影响。螺类采自位于加拿大 Alberta 中北部和中部的 7 个湖泊,在 5 月中旬至 9 月中旬每两周采集一次。这些湖泊包括贫营养至超富营养等各种营养水平。螺体(不包括壳)中的 MC 含量用 HPLC 法进行测定,检测限约为 1 ng/20 $\mu$ L 注射剂量。

在 7 个湖泊中采集到的 3 种螺类分别是静水椎实螺(*Lymnaea stagnalis*)、肺螺(*Helisoma trivolvis*) (图 6-10)和膀胱螺(*Physa gyrina*)。这些螺体内的 MC-LR 的含量(图 6-12)与浮游植物细胞内的毒素含量(图 6-11)均有显著的正相关,而与水中溶解的 MC-LR 含量无关,此外, *Lymnaea stagnalis* 和 *Physa gyrina* 体内的毒素含量与 *Microcystis* spp. 在浮游植物中的相对丰度显著相关,而 *Helisoma trivolvis* 的情况则则是无显著相关(表 6-4)。因此, Zurawell 等(1999)认为,湖泊的营养状态对肺螺体内毒素的存在及含量有重要影响。



图 6-10 *Helisoma trivolvis* 的图片(引自美国查尔斯顿学院生物系的 Dillon R T Jr 博士)  
Fig. 6-10 A photo of *Helisoma trivolvis* (Cited from Dr. Dillon R T Jr, Department of Biology, College of Charleston, Charleston, SC, USA)

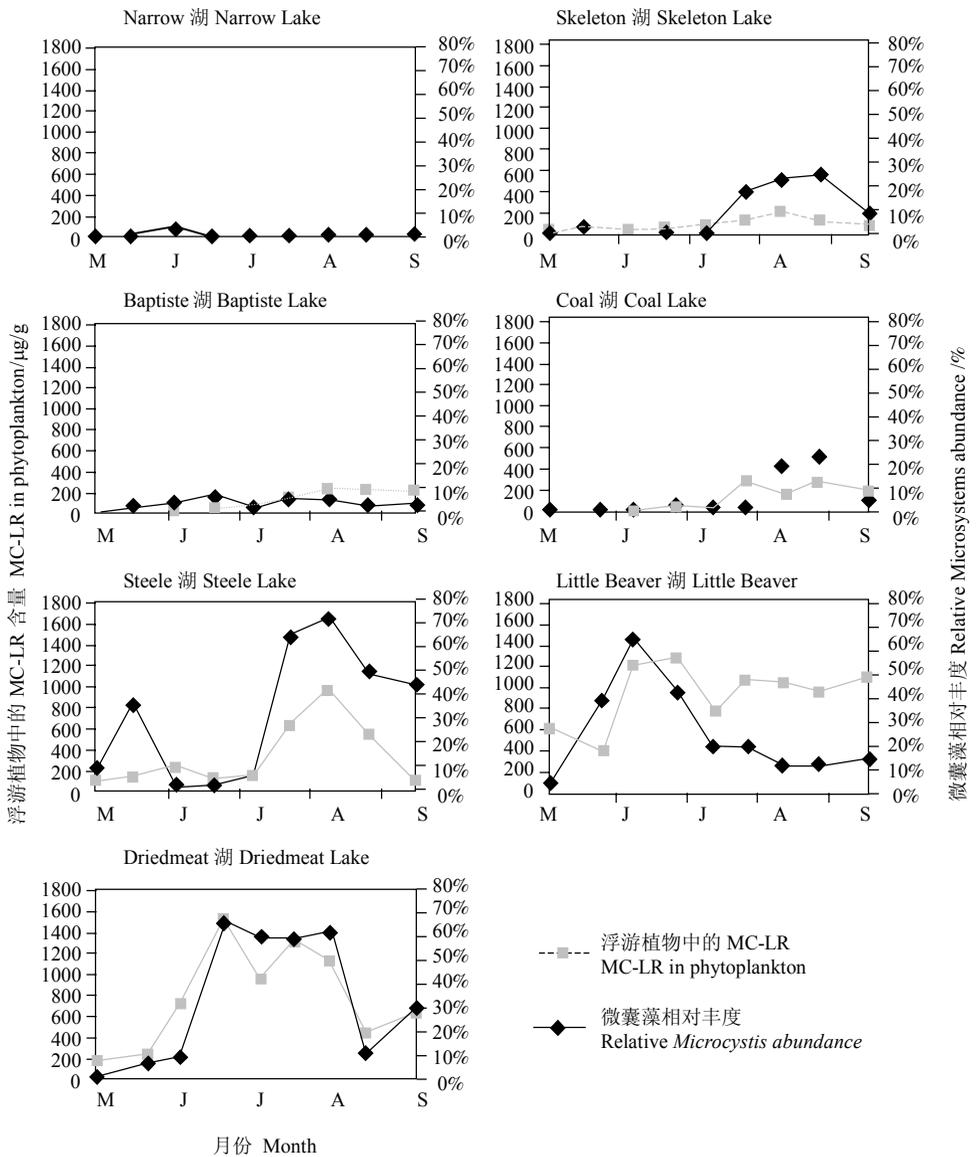


图 6-11 1995 年 5 月中旬至 9 月中旬，7 个湖泊中浮游植物的 MC-LR 含量( $\mu\text{g/g}$ )和微囊藻的相对丰度(微囊藻细胞数占总浮游植物细胞数的百分比)的季节变化(引自 Zurawell et al.1999)

Fig. 6-11 Seasonal changes (mid-May through mid-September 1995) of MC-LR concentration in phytoplankton ( $\mu\text{g/g}$ ) and relative *Microcystis* spp.abundance (proportion of *Microcystis* spp. cells from total phytoplankton cells/mL, expressed as a percentage) in the seven studied lakes

Cited from Zurawell et al.1999)



表 6-4 3 种肺螺组织中 MC-LR 含量与浮游植物细胞中的 MC-LR、水中的 MC-LR 和微囊藻的相对丰度之间相关关系的总结。用于相关分析的数据来自 7 个湖泊中的 9 次采样，并经对数-对数转换(除微囊藻丰度用反正弦-平方根转换外)

Table 6-4 Summary of correlation analyses for the tissue concentration of MC-LR in three species of pulmonate snail ( $\mu\text{g/g}$ ) versus MC-LR in phytoplankton ( $\mu\text{g/g}$ ), MC-LR in water ( $\mu\text{g MC-LReq./L}$ ) and relative *Microcystis* spp. abundance. Correlation analyses were performed on log-log transformed data (except relative *Microcystis* spp. abundance, which was arcsine-square root transformed) from the seven study lakes on nine sampling dates

湖泊营养状态的度量 Measures of lake trophic status	螺组织中的 MC-LR MC-LR in snail tissue								
	静水椎实螺 <i>L. stagnalis</i>			膀胱螺 <i>P. gyrina</i>			肺螺 <i>H. trivolvis</i>		
	r	P-value	d.f.	r	P-value	d.f.	r	P-value	d.f.
浮游植物胞内的 MC-LR MC-LR in phytoplankton	0.50	0.0004	44	0.37	0.03	29	0.41	0.01	31
水中的 MC-LR MC-LR in water	0.16	>0.29	44	0.14	0.45	29	0.19	>0.28	31
微囊藻相对丰度 Relative <i>Microcystis</i> abundance	0.49	0.0007	43	0.47	0.008	29	0.22	>0.22	31

(引自 Zurawell et al. 1999)(Cited from Zurawell et al. 1999)

## 七、日本琵琶湖淡水田螺 *Sinotaia histrica* 肝胰腺和肠道中 MC 含量的季节变动

Ozawa 等(2003)研究了琵琶湖中淡水田螺 *Sinotaia histrica* 肝胰腺和肠道中 MC 的季节变动。2000 年 7~10 月，琵琶湖的浮游植物优势种一般是蓝藻(*Microcystis aeruginosa*、*Oscillatoria kawamurae* 和 *Anabaena spiroides*)，但是，9 月的优势种是 *Volvox aureus*。浮游植物、螺肠道和肝胰腺中的 MC 含量用 HPLC 法测定。结果表明，当湖泊中浮游植物体内的藻毒素含量最高时(10 月)，螺肠道和肝胰腺中的毒素含量也最高(表 6-5)，表明浮游植物细胞内的毒素含量显著影响肝胰腺中毒素的积累。

表 6-5 琵琶湖中叶绿素 a 含量以及悬浮物和螺体内 MC 含量的变化

Table 6-5 Changes in chlorophyll a, microcystins in seston and snails from Lake Biwa

日期 Date	Chl-a	MC/( $\mu\text{g/g DW}$ ) <sup>a</sup>		MC/( $\mu\text{g/L}$ ) <sup>b</sup>		MC/( $\mu\text{g/g DW}$ ) <sup>c</sup>	
		RR	LR	RR	LR	RR	LR
1998-9-7						<sup>H</sup> ND	<sup>H</sup> ND
1999-9-10						<sup>H</sup> ND	<sup>H</sup> ND
2000-7-12						<sup>H</sup> ND	<sup>H</sup> ND
						<sup>I</sup> 2.70	<sup>I</sup> ND
2000-7-21	3.01	30.2	21.5	0.276	0.197		
2000-8-16	8.79	ND	ND	ND	ND	<sup>H</sup> ND	<sup>H</sup> ND
						<sup>I</sup> 2.59	<sup>I</sup> ND
2000-9-18	2.73	ND	ND	ND	ND	<sup>H</sup> Trace	<sup>H</sup> ND
						<sup>I</sup> 0.531	<sup>I</sup> 4.29
2000-10-11	9.68	190	93.5	0.286	0.190	<sup>H</sup> 1.66	<sup>H</sup> 1.54
						<sup>I</sup> 12.8	<sup>I</sup> 6.70

ND-MC 未被检测出 not detected; a: 用浮游生物网采集的藻类的单位干重的 MC 浓度; b: 每升湖水中的 MC 浓度 MC concentration per liter of lake water; c: 螺体的 MC 含量 MC concentration in snails; H: 螺的肝胰腺 Hepatopancreas of snail; I: 螺的肠道 Intestine of snail (引自 Ozawa et al. 2003)(Cited from Ozawa et al. 2003)

## 八、中国巢湖铜锈环棱螺各组织中 MC 含量的季节变化

Chen 等(2005)于 2003 年 6 月至 11 月,研究了安徽巢湖的铜锈环棱螺(*Bellamya aeruginosa*)各组织中 MC-LR 和 MC-RR 含量的季节变化规律。铜锈环棱螺属田螺科(Viviparidae),广泛分布于我国的湖泊、河流、沟渠和池塘中。铜锈环棱螺是巢湖螺类的优势种,既被居民直接食用,又被用于河蟹养殖的饲料。用于毒素分析的铜锈环棱螺采自忠庙地区,该处经常由于风力作用聚集有厚厚的蓝藻水华;调查期间巢湖蓝藻水华的优势种为铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)和螺旋鱼腥藻(*Anabaena spiroides*)。所采集的螺的壳宽和壳高分别为(13.36±4.87)mm 和(21.64±3.85)mm。采集的螺放入便携式冰箱后带回实验室,再将螺解剖分为消化道(包括胃)、肝胰腺、性腺和足,因为单个个体无法满足各器官的毒素分析,每次将 60 个个体的某种器官合并为一个样(因此每个测定值代表 60 个个体的平均毒素含量),所采集到的器官放入超低温冰箱(-80℃)中保存。一般取 0.5 g 冷冻干燥的器官样品进行毒素的抽提与分析。毒素的定性与定量分析分别基于 LC-MS 和 HPLC。

Chen 等(2005)通过对 6 月份铜锈环棱螺的肠含物进行显微镜检发现几乎均为微囊藻细胞。铜锈环棱螺的消化道、肝胰腺、性腺和足中 MC-LR 和 MC-RR 含量的季节变化如图 6-13 所示。肝胰腺中的 MC 平均含量(4.14 μg/g DW)显著高于消化道(1.693 μg/g DW)或者性腺(0.715 μg/g DW)(成对的  $t$  检验,  $P < 0.05$ )。消化道的 MC 含量与肝胰腺的 MC 含量有一定的正相关性( $r = 0.64$ ,  $P = 0.171$ ),而肝胰腺的 MC 含量与性腺的 MC 含量则无相关性( $r = -0.117$ ,  $P = 0.825$ )。MC-LR/MC-RR 之比的平均值在消化道、肝胰腺和性腺中分别为 0.44、0.63 和 0.96。

Chen 等(2005)认为,由于 MC 主要分布在肝胰腺、消化道和性腺,而只有很少量分布在可食器官足中,因此,在吃螺前如果将这些有毒部分去掉,对人类健康的危害可能不很显著。但是,在我国有一种传统的吃法就是将螺壳顶部少量剪掉后水煮或红烧,因此,如果螺被 MC 污染,将通过这种方式制作出来的汤喝掉可能有健康危险。

## 九、自然水体中各种软体动物体内最大 MC 含量比较

从自然水体中采集到的软体动物体内的 MC(甲醇可萃取)也可以达到惊人的含量(表 6-6),如从日本 Suwa 湖采集的圆顶珠蚌和褶纹冠蚌的肝胰腺中的 MC-LR 含量分别可达 420 μg/g DW 和 297 μg/g DW。与蚌相比,有关螺体内 MC 的检测要少得多。在软体动物体内 MC 的检测方法中,以 HPLC(UV 或 PDA)最多,其次为 ELISA 和 PPIA 法, MMPB 法最少。

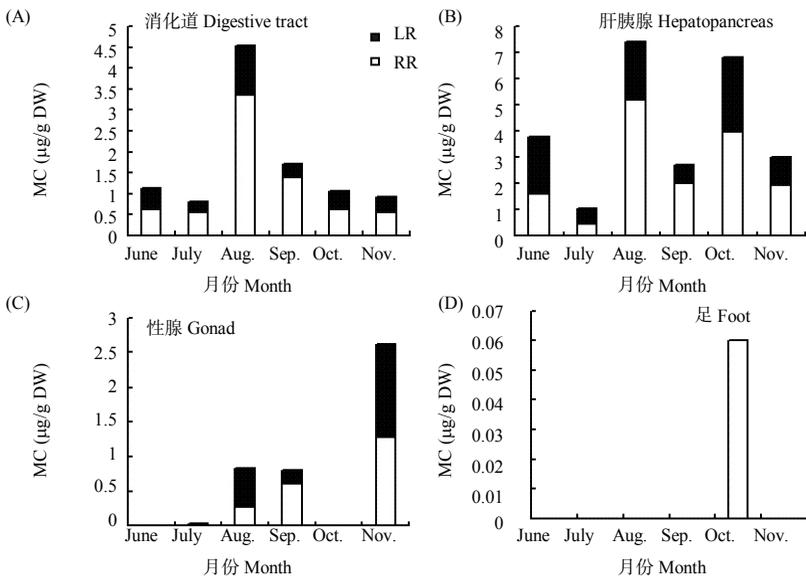


图 6-13 在 2003 年 6~11 月期间，巢湖铜锈环棱螺消化道(A)、肝胰腺(B)、性腺(C)和足(D)中 MC-LR 和 MC-RR 含量的季节变化(引自 Chen et al. 1995)

Fig. 6-13 The seasonal changes of MC-LR and MC-RR concentrations (μg/g DW) in (A) digestive tract, (B) hepatopancreas, (C) gonad and (D) foot of *Bellamya aeruginosa* in Lake Chaohu during June and November, 2003 (Cited from Chen et al. 1995)

表 6-6 自然水体中各种软体动物体内最大 MC 含量比较  
Table 6-6 A comparison of microcystin contents in bivalves collected from natural waters

种类 Species	器官 Organ	毒素 Toxin	最大浓度 Max. concentration	分析方法 Analysis method	地点 Location	文献 References
双壳纲 Bivalvia						
蚌(未给出种名) Mussel (no name was given)	Whole	MC-LR	0.6 µg/g WW	PPIA	加拿大东北太平洋海域的 Northeastern Pacific Ocean, Canada	Chen et al. 1993
一种贻贝 <i>Mytilus edulis</i>	Whole	MC	0.022 µg/g WW	PPIA	加拿大 Campbell 河 Campbell River, B.C., Canada	Williams et al. 1997b
	Whole	MC	63.4 µg/g WW	MMPB(Lemieux Oxidation GC/MS)	加拿大 Campbell 河 Campbell River, B.C., Canada	Williams et al. 1997b
	Whole	Hepatotoxin	1.49 µg/g DW	ELISA	波罗的海北部 Northern Baltic Sea	Sipiä et al. 2002
一种无齿蚌 <i>Anodonta grandis simpsoniana</i>	Whole	MC-LR	1.35 µg/g DW	PPIA	加拿大艾伯塔的 Driedmeat 湖 Lake Driedmeat, Alberta, Canada	Prepas et al. 1997
背角无齿蚌 <i>A. woodiana</i>	Hepatopancreas	MC-RR	0.21 µg/g WW	HPLC-UV (Frit-FAB LC/MS 定性)	日本 Suwa 湖 Lake Suwa, Japan	Watanabe et al. 1997
	Hepatopancreas	MC-RR, MC-LR	12.6 µg/g DW	HPLC-PDA	日本 Suwa 湖 Lake Suwa, Japan	Yokoyama et al. 2002
	Hepatopancreas, intestine, visceral mass, gill, foot and rest	MC-RR, MC-LR, MC-YR	5.96, 7.88, 0.31, 0.12, 0.19, 0.11 µg/g DW	HPLC-UV (LC-MS 定性)	中国太湖 Lake Taihu, China	Chen and Xie 2005

种类	器官	毒素	最大浓度	分析方法	地点	文献
Species	Organ	Toxin	Max. concentration	Analysis method	Location	References
褶纹冠蚌 <i>Cristaria plicata</i>	Hepatopancreas	MC-RR, MC-LR	0 µg/g WW	HPLC-UV (Frit-FAB LC/MS 定性)	日本 Suwa 湖	Watanabe et al. 1997
	Hepatopancreas	MC-RR, MC-LR	297 µg/g DW	HPLC-PDA	Lake Suwa, Japan 日本 Suwa 湖	Yokoyama et al. 2002
	Hepatopancreas, intestine, visceral mass, gill, foot and rest	MC-RR, MC-LR, MC-YR	38.48, 5.64, 0.71, 0.22, 0.23, 0.22 µg/g DW	HPLC-UV (LC-ESI-MS 定性)	Lake Suwa, Japan 中国太湖	Chen and Xie 2005b
	Hepatopancreas	MC-RR, MC-LR	0 µg/g DW	HPLC-PDA	Lake Taihu, China 日本 Biwa 湖	Ozawa et al. 2003
仙台蚬 <i>Corbicula sandai</i>	Hepatopancreas	MC-RR, MC-LR	12.50, 20.65, 0.80, 0.23, 0.58, 0.49 µg/g DW	HPLC-UV (LC-ESI-MS 定性)	Lake Biwa, Japan 中国太湖	Chen and Xie 2005b
	Hepatopancreas, intestine, visceral mass, gill, foot and rest	MC-RR, MC-LR, MC-YR	13.23, 2.53, 1.70, 0.64, 0.52, 0.61 µg/g DW	HPLC-UV (LC-ESI-MS 定性)	中国太湖	Chen and Xie 2005b
	Hepatopancreas	MC-RR, MC-LR	2.7 µg/g WW	HPLC-UV	Lake Taihu, China 日本 Suwa 湖	Watanabe et al. 1997
圆顶珠蚌 <i>Unio douglasiae</i>	Gill and muscle	MC-RR, MC-LR	2.0 µg/g WW	(Frit-FAB LC/MS 定性) HPLC-UV	Lake Suwa, Japan 日本 Suwa 湖	Watanabe et al. 1997
	Gonad	MC-RR, MC-LR	1.19 µg/g WW	HPLC-UV	Lake Suwa, Japan 日本 Suwa 湖	Watanabe et al. 1997
	Gut	MC-RR, MC-LR	1.31 µg/g WW	(Frit-FAB LC/MS 定性) HPLC-MS	Lake Suwa, Japan 日本 Suwa 湖	Watanabe et al. 1997

种类	器官	毒素	最大浓度	分析方法	地点	文献
Species	Organ	Toxin	Max. concentration	Analysis method	Location	References
	Hepatopancreas	MC-RR, MC-LR	420 µg/g DW	HPLC-PDA	日本 Suwa 湖 Lake Suwa, Japan	Yokoyama et al. 2002
斑纹蚌 <i>D. polymorpha</i>	Whole	MC-LReq	6 µg/g DW	HPLC-PDA	荷兰 IJsselmeer 湖 Lake IJsselmeer, Netherlands	Ibelings et al. 2005 b
斑纹蚌	Whole	MC-LReq	约 0.02 µg/g WW	ELISA	美国 Erie 湖 Lake Erie, USA	Babcock-Jackson et al. 2002
<i>Dreissena</i> spp. 一种白樱蛤 <i>Macoma balthica</i>	Whole	Hepatotoxin	0.1 µg/g DW	ELISA	波罗的海北部 Northern Baltic Sea	Sipiä et al. 2002
腹足纲						
<b>Gastropoda</b>						
铜锈环棱螺	Hepatopancreas, digestive tract, gonad, foot	MC-RR, MC-LR	7.42, 4.54, 2.62, 0.06 µg/g DW	HPLC-UV (LC-MS 定性)	中国巢湖 Lake Chaohu, China	Chen et al. 2005
<i>Bellamya aeruginosa</i>						
一种田螺	Hepatopancreas, digestive tract	MC-RR, MC-LR	3.2, 19.5 µg/g DW	HPLC-PDA	日本琵琶湖 Lake Biwa, Japan	Ozawa et al. 2003
<i>Sinotaia histrica</i>						
静水椎食螺	Whole	MC-LR	140 µg/g WW	HPLC-UV	加拿大 Steele 湖 Lake Steele, Canada	Zurawell et al. 1999
<i>Lymnaea stagnalis</i>						
膀胱螺	Whole	MC-LR	129 µg/g WW	HPLC-UV	加拿大 Driedmeat 湖 Lake Driedmeat, Canada	Zurawell et al. 1999
<i>Physa gyrina</i>						

DW: 干重 dry weight; WW: 湿重 wet weight; whole: 整体; hepatopancreas: 肝胰腺; intestine or gut: 肠道; gonad: 性腺; visceral mass: 内脏团;

gill: 鳃; foot: 足; muscle: 肌肉; rest: 其余

## 第七章 MC 在虾蟹体内的生物累积

虾蟹体内 MC 的累积受到的关注程度远不及鱼类和软体动物，这可能与欧美国家的人们很少食用淡水虾蟹有关。卤虫(*Artemia salina*)是一种重要的实验动物，因此偶有用卤虫作为实验材料来研究 MC 的接触毒性(contact toxicity)(Delaney and Milkins 1995, Metcalf et al. 2002)。欧洲学者(Liras et al. 1998, Vasconcelos et al. 2001)关注 MC 通过在淡水螯虾(crayfish)体内的累积沿食物链传递到更高级的生物(如人类)，而我国学者(Chen and Xie 2005a)则关注 MC 在淡水虾体内的累积导致人类直接食用的安全性问题，因为淡水虾蟹类是我国民众主要的水产食品之一。

### 一、MC 对卤虫的急性接触毒性实验

卤虫(图 7-1)隶属于节肢动物门甲壳纲鳃足亚纲无甲目(Anostraca)卤虫科(Artemiidae)卤虫属(*Artemia*)。卤虫科仅有一属一种。卤虫为一种重要的饵料生物和良好的实验动物材料。

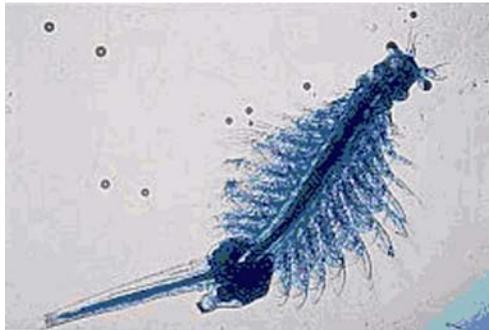


图 7-1 抱有卵囊卤虫的图片(引自 Ghent 大学卤虫文献中心)

Fig. 7-1 Photo of *Artemia salina* with egg sac (Cited from Artemia Reference Center, Ghent University)

Delaney 和 Milkins (1995)进行了 MC 对卤虫浸泡(immersion)影响的实验。MC-LR 提纯自铜绿微囊藻 *Microcystis aeruginosa* Kuetzing emend. Elenkin strain CCAP 1450/4(分离自加拿大安大略的 Little Rideau 湖)。将 5 只卤虫幼虫浸泡在不同浓度(0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的 MC-LR 溶液中，每个处理(浓度)有 8 个重复。实验温度 30  $^{\circ}\text{C}$ ，持续 24 h。结果表明，MC-LR 对卤虫的 24 h  $\text{LC}_{50}$  为 3.75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在该实验中，溶解性 MC-LR 浓度高达 0.5~40

mg/L, 这在自然的水体中是很难达到的水平。这同时也表明, MC-LR 对卤虫的接触毒性低。

Metcalf 等(2002)在室温(未注明)条件下, 将卤虫幼虫浸泡在不同浓度的 MC-LR 溶液中, 获得 24 h、40 h、48 h、64 h 和 72 h 的 LC<sub>50</sub> 分别为 4.58 μg/mL、3.00 μg/mL、2.80 μg/mL、1.19 μg/mL 和 0.85 μg/mL。

## 二、有毒底栖丝状蓝藻对美国小龙虾影响的实验研究

美国小龙虾 *Pacifastacus leniusculus*(图 7-2)隶属于甲壳纲(Crustacea)十足目(Decapoda)爬行亚目(Reptantia)河虾科(Astacidae)螯虾亚科(Cambaridae)。本属仅分布在北美洲的太平洋倾斜面上。自 20 世纪 60 年代以来, 该种被引入到欧洲的二十多个国家(Damain et al. 2004)。



图 7-2 美国小龙虾 *Pacifastacus leniusculus* 的图片(引自 LVVG Leitseite)

Fig. 7-2 A photo of *Pacifastacus leniusculus* (Cited from LVVG Leitseite)

Liras 等(1998) 通过野外和室内实验, 研究了从北美引入到瑞典的美国小龙虾能否摄食有肝毒性的底栖丝状蓝藻——清洁颤藻(*Oscillatoria sancta*)及有毒(含 MC)的阿氏颤藻(*Planktothrix agardhii*)是否对 *P. leniusculus* 有急性毒性。

他们将 24 只雄性和 12 只雌性 *P. leniusculus* 成体(来自瑞典南部的一个无蓝藻水华发生的养殖场)圈养在瑞典南部的一个小龙虾养殖池塘(crayfish pond)中。该池塘中发生少量的底栖丝状蓝藻——清洁颤藻水华, 通过小白鼠生物测试(mouse-bioassay), 确定清洁颤藻有肝毒性。通过对圈养在该池塘中的 *P. leniusculus* 的胃含物的分析表明, 发现共有 13 种不同的食物, 其中 32 个个体的胃含物中含有有毒的清洁颤藻, 但是碎屑、底泥和腐烂的高等植物似乎是主要的胃含物。

为了弄清摄食蓝藻是否对 *P. leniusculus* 产生影响以及藻毒素是否在 *P. leniusculus* 的肝胰腺中累积, 在 10 L 的水族箱(每个水族箱中喂养一个 *P. leniusculus* 成体, 并不断充气)中进行了 15 天的摄食实验。*P. leniusculus* 的来源同上。一共有 3 种食物类型: ① 高毒处理: 有肝毒性的阿氏颤藻 CYA 126+螯虾颗

粒饲料(pelleted crayfish food); ② 低毒处理: 低毒的阿氏颤藻 Arungen 200983+螯虾颗粒饲料; ③ 对照: 螯虾颗粒饲料。每个食物类型有 12 个重复。实验温度为 13.5℃。每天清洁水族箱, 并将水族箱中的水更换一半, 每天投饵。

根据 HPLC 的分析结果, 阿氏颤藻 CYA 126 共产 4 种 MC, 总含量为 3.6 mg/g DW, 阿氏颤藻 Arungen 200983 的 MC 含量仅为 0.017 mg/g DW。通过摄食量的计算, 实验期间, 每个 *P. leniusculus* 在高毒、低毒和对照组分别摄取了 430 μg、2.4 μg 和 0 μg 的 MC。经过 15 天的实验, 肝胰腺的重量(平均占体重的 6.6%)在各处理间无显著差异; 在高毒和低毒处理中, 分别有 9 个和 6 个个体的肝胰腺有暗绿色斑点(dark-green spot), 而对照组的所有个体的肝胰腺正常。Liras 等(1998)认为, 这不一定反映肝胰腺的损伤, 也可能仅仅为蓝藻的色素而已。在高毒组中, 通过 HPLC 的分析, 在 50%的个体的肝胰腺中检测到 MC 的存在。但是, 由于其他化合物的干扰, 无法准确计算已确定为 MC 的色谱峰的面积, 从而未能准确定量肝胰腺中的 MC 含量。虽然 MC 在 *P. leniusculus* 的肝胰腺中有积累, 但含毒的阿氏颤藻似乎未对 *P. leniusculus* 产生急性毒性, 因为整个实验期间, 所有个体都存活着, 并保持活动和摄食。

Liras 等(1998)认为, 阿氏颤藻的 MC 能在 *P. leniusculus* 的肝胰腺中积累, 从而沿着食物链向上传递; 即便是有肝毒性的底栖蓝藻水华发生时, *P. leniusculus* 也不回避摄食蓝藻; 有肝毒性的阿氏颤藻对 *P. leniusculus* 无急性毒性。

### 三、克氏原螯虾对 MC 摄取和清除的实验研究

克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)(图 7-3)属甲壳纲(Crustacea)十足目(Decapoda)爬行亚目(Reptantia)螯虾科(Cambaridae)。该种原产地为美国南部, 后被广泛引种到世界各地作为食物, 目前除大洋洲(Oceania)外, 所有其他大陆均有存在。在葡萄牙, 该虾最早于 1979 年记录自 Alentejo 地区的 Caia 河, 由于该种的迁移能力、对环境的适应能力及对恶劣水质的耐受性都很强, 现已遍及整个葡萄牙(Vasconcelos et al. 2001)。

Vasconcelos 等(2001)进行了克氏原螯虾摄食有毒铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)后, 引起的 MC 的累积及停喂有毒蓝藻后的毒素清除实验。

所用的铜绿微囊藻分离自葡萄牙的 Mira 湖。其中, 有毒株 IZANCYA2 主要产 MC-LR。而 IZANCYA6 通过高达 1500 mg/kg 剂量的小白鼠的毒性试验被证实为无毒株。

克氏原螯虾成体(头胸部长度 4.8~5.3 cm)采自 Frossos 湖并驯化。将 40 个克氏原螯虾分成两组(每组 20 个)分别饲养在两个容积为 30 L 的 PVC 桶中, 将其中的一组喂以有毒的微囊藻(冷冻干燥的藻粉), 而另一组喂以无毒的微囊藻(冷冻干燥的藻粉), 共两个星期。食物每周投喂两次, 水两周换一次。每周取样两次, 每次

从每组取 3 个克氏原螯虾用于毒素分析。在第二周的周末，将喂以有毒微囊藻的克氏原螯虾解剖，分别收集肌肉、肠道、肝胰腺及其他部分进行毒素的分析。经过两周的累积实验，再改为投喂商用猫饲料(commercial cat food)两个星期。也是每周取两次样，处理方法同上。实验期间的水温为 15.9~18.4℃，微囊藻毒素(MC-LR)分析用 ELISA 法，灵敏度为 0.1 ng MC/mL。



图 7-3 克氏原螯虾的图片(引自 Marc Carrière, <http://www.les-snats.com>)

Fig. 7-3 A photo of the crayfish *Procamburus clarkii* (Cited from Marc Carrière, <http://www.les-snats.com>)

克氏原螯虾累积 MC 的最大值为 2.9  $\mu\text{g/g DW}$ (在第 11 天); 而投喂的微囊藻 IZANCYA2 细胞中的毒素 MC 含量为 2.3  $\text{mg/g DW}$ 。但是，摄取实验中的克氏原螯虾所累积的 MC 含量在不同采样间的变异很大(图 7-4)，Vasconcelos 等(2001)将其归结为不同时间摄食量的变异。在清除实验期间，MC 的含量在第 14 天有一个快速的下降，第 17 天又有显著的上升，至第 23 天，MC 下降到几乎无法检测的水平。摄取实验结束时，各器官中 MC 含量的分布是肠道最高(53%)，其次为肝胰腺(38%)，肌肉[腹部(abdomen)，也是人们通常食用的部分]中的含量很低(<0.1%)，而其他器官总计为 9%。Vasconcelos 等(2001)认为，由于肌肉中的毒素含量很低，从食用的角度来说，对人类健康的影响较小，然而，如果整个克氏原螯虾(包括肠道和肝胰腺)被用作家畜(如牛)的饲料，则毒素有可能在肝脏中积累，而进一步传递到摄食这些器官的人，因而是危险的。

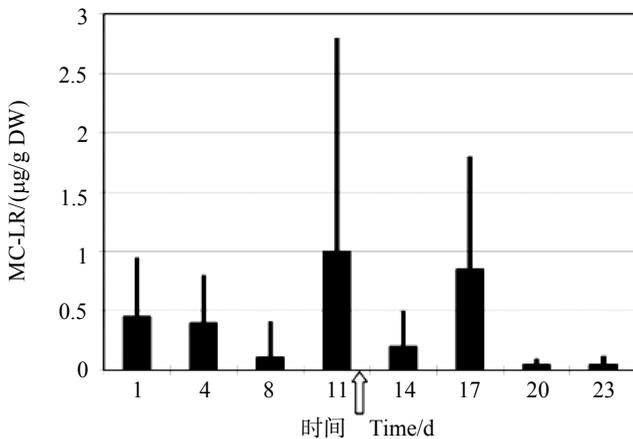


图 7-4 在两周的摄取和两周的清除实验期间，克氏原螯虾体内 MC 的动态变化(引自 Vasconcelos et al. 2001)

箭头表示暴露期的结束

Fig. 7-4 Dynamics of MC in the crayfish *Procamburus clarkii* during a 2-week uptake exposure and a 2-week depuration period(Cited from Vasconcelos et al. 2001)

Arrow indicates the end of the exposure period

#### 四、巢湖秀丽白虾、日本沼虾和克氏原螯虾各组织中的 MC 累积

秀丽白虾(*Palaemon modestus*)和日本沼虾(*Macrobrachium nipponensis*)(图 7-5)隶属于甲壳纲(Crustacea)十足目(Decapoda)游泳亚目(Natantia)长臂虾科(Palaemonidae)。秀丽白虾的自然分布区南到福建，北至俄罗斯伯北利亚，是我国常见的重要经济虾类，在大型湖泊中常占虾类总产量的半数以上；日本沼虾广布于我国的南北各地，相邻的俄罗斯西北利亚和越南也有发现(李新正等 2003)。一般来说，日本沼虾喜欢沿岸带生境，因而往往在洪湖这样的浅水草型湖泊中占优势(孙建贻等 1999)，而秀丽白虾喜欢敞水生境，因而在像太湖和巢湖这样的敞水生境丰富的湖泊中易占优势(施炜钢 1995)。

Chen 和 Xie(2005a)于 2003 年 6~11 月研究了巢湖中秀丽白虾和日本沼虾各种器官(胃、肝胰腺、性腺、肌肉、卵和鳃)中的 MC(MC-RR 和 MC-LR)含量及其季节变化规律。虾体内的 MC 分别用 LC-ESI-MS 和 HPLC-UV 进行定性和定量。平均来看，秀丽白虾器官中累积的 MC 远高于日本沼虾(图 7-6、图 7-7)；两种虾器官中的平均 MC 含量为：胃>肝胰腺>性腺>鳃>肌肉。如果不包含胃含物，肝胰腺中的 MC 负荷最高(秀丽白虾 41%，日本沼虾 41.4%)，其次是性腺、卵和肌肉，鳃最小(表 7-1)。关于器官 MC 含量的相关性，胃与肝胰腺(秀丽白虾： $r = 0.48$ ， $P=0.414$ ；日本沼虾： $r = -0.159$ ， $P = 0.764$ )或胃与肌肉(秀丽白虾： $r = -0.371$ ，

$P = 0.539$ ; 日本沼虾:  $r = -0.297$ ,  $P = 0.568$ )均无相关性(这可能由于胃含物中的 MC 受到各种因素, 如采样时间和过程、消化程度以及食物的异质性等的影 响), 肝胰腺与肌肉(秀丽白虾:  $r = 0.509$ ,  $P = 0.381$ ; 日本沼虾:  $r = 0.391$ ,  $P = 0.443$ ) 也无相关性(可能由于肌肉中的含量较低, 因此误差较大)。



图 7-5 巢湖的秀丽白虾和日本沼虾的图片

Fig. 7-5 A photo of the shrimps *Palaemon modestus* and *Macrobrachium nipponensis* in Lake Chaohu

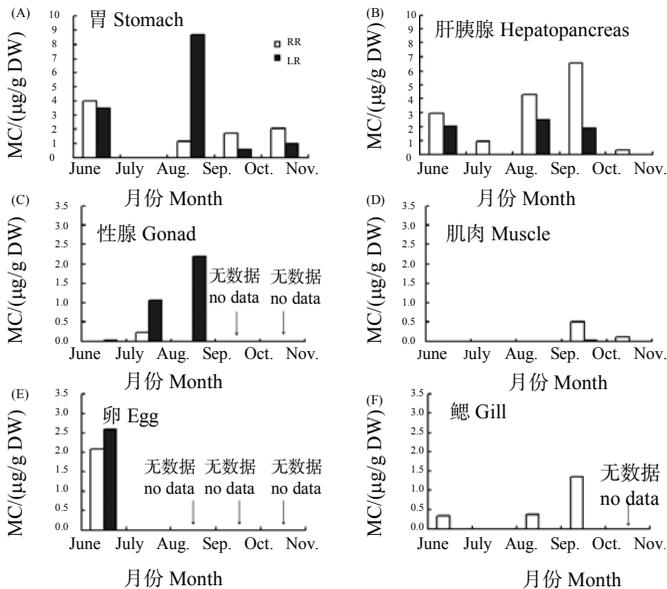


图 7-6 2003 年巢湖秀丽白虾的胃(A)、肝胰腺(B)、性腺(C)、肌肉(D)、卵(E)和鳃

(F)中 MC-LR 和 MC-RR 浓度(µg/g DW)的季节变化(引自 Chen and Xie 2005a)

Fig. 7-6 The seasonal changes of MC-LR and MC-RR concentrations (µg/g DW) in (A) stomach, (B) hepatopancreas, (C) gonad, (D) muscle, (E) egg and (F) gill of the shrimp *Palaemon modestus* in Lake Chaohu in 2003 (Cited from Chen and Xie 2005a)

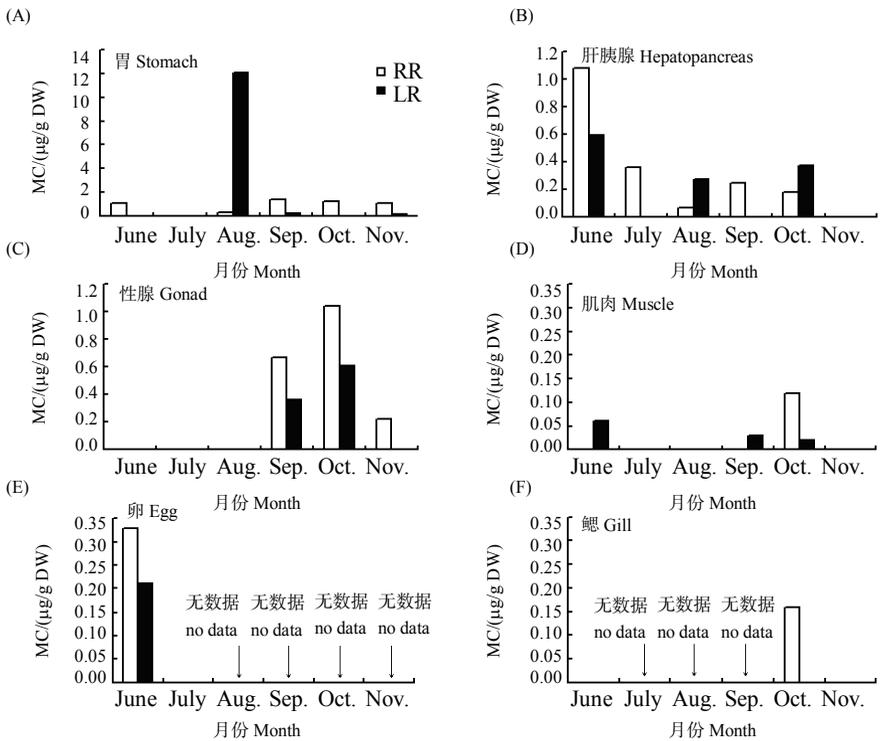


图 7-7 2003 年巢湖日本沼虾的胃(A)、肝胰腺(B)、性腺(C)、肌肉(D)、卵(E)和鳃(F)中 MC-LR 和 MC-RR 浓度( $\mu\text{g/g DW}$ )的季节变化(引自 Chen and Xie 2005a)

Fig. 7-7 The seasonal changes of MC-LR and MC-RR concentrations ( $\mu\text{g/g DW}$ ) in (A) stomach, (B) hepatopancreas, (C) gonad, (D) muscle, (E) egg and (F) gill of the freshwater shrimp *Macrobrachium nipponensis* in Lake Chaohu in 2003 (Cited from Chen and Xie 2005a)

秀丽白虾比日本沼虾累积更多的 MC 可能与它们的营养生态位不同有关。在巢湖，浮游植物(主要是蓝藻)是主要的初级生产者，而水生高等植物仅分布在沿岸带。从捕捞经验来看，在敞水区捕的虾以秀丽白虾为主，而在沿岸带捕的虾以日本沼虾为主。依据同时期的稳定性同位素分析，秀丽白虾的  $\delta^{13}\text{C}$  值与浮游植物接近，而日本沼虾的  $\delta^{13}\text{C}$  值与水生高等植物接近(两种虾的  $\delta^{15}\text{N}$  值几乎没有差异)，这表明，秀丽白虾可能摄取了更多的蓝藻(因此较多的 MC)，而日本沼虾可能更多地依赖于水生高等植物(因此较少的 MC)。这表明，同一个科的不同属生物可能累积不同水平的 MC，因此，要预测不同虾的 MC 生物累积，需研究每一个种的累积模式(Chen and Xie 2005a)。

令人吃惊的是，在卵中也有较大的 MC 负荷(日本沼虾为 8.4%，秀丽白虾为 29.0%)，这表明，从成体传递到后代的高含量的 MC 可能显著影响这些动物的繁殖行为乃至种群动态。这些无脊椎动物卵中高含量的 MC 可能意味着 MC 具有传递到哺乳动物后代中去的危险，因此需要进一步研究(Chen and Xie 2005a)。

秀丽白虾和日本沼虾体内的 MC 不仅大量地累积于肝胰腺(平均值分别为 4.29  $\mu\text{g/g}$  和 0.53  $\mu\text{g/g}$ ), 也大量累积于性腺(平均值分别为 1.17  $\mu\text{g/g}$  和 0.48  $\mu\text{g/g}$ ) 和卵(平均值分别为 2.34  $\mu\text{g/g}$  和 0.27  $\mu\text{g/g}$ ), 克氏原螯虾性腺中的 MC 含量也达 0.93  $\mu\text{g/g}$ (表 7-2)。类似现象在巢湖的铜锈环棱螺中也观察到(Chen et al. 2005)。从性腺中的 MC 负荷来看, 秀丽白虾和日本沼虾分别为 14.1%和 37.2%。上述结果表明, 无论根据含量还是负荷, 淡水无脊椎动物的生殖系统均是 MC 累积的第 2 个重要器官。迄今为止, 在哺乳动物中, 还未报道 MC 在生殖系统中大量累积的现象(Chen and Xie 2005a)。

表 7-1 2003 年 6 月~11 月期间, 巢湖秀丽白虾和日本沼虾不同器官的干重占总体重百分比、不同器官的 MC 含量及所占百分比

Table 7-1 Dry weight of the different shrimp organs as a percentage of total weight, MC contents and percentage of toxins present in the different organs of two freshwater shrimps collected from Lake Chaohu during June and November 2003

种类 Species	组织 Tissue	干重 DW/%	MC/( $\mu\text{g/g}$ )	毒素 Toxins <sup>1)</sup> /%	毒素 Toxins <sup>2)</sup> /%
秀丽白虾 <i>P. modestus</i>	胃 Stomach	6.9	4.53 (0~9.83)	32.2	
	肝胰腺 Hepatopancreas	6.3	4.29 (0.33~8.40)	27.8	41.0
	性腺 Gonad	7.9	1.17 (0.03~2.19)	9.6	14.1
	卵 Egg	8.2	2.34 (0~4.67)	19.7	29.0
	肌肉 Muscle	67.4	0.13 (0~0.53)	9.0	13.3
	鳃 Gills	3.4	0.51 (0~1.34)	1.8	2.6
日本沼虾 <i>M. nipponensis</i>	胃 Stomach	7.5	2.92 (0~12.42)	54.6	
	肝胰腺 Hepatopancreas	14.2	0.53 (0~1.67)	18.8	41.4
	性腺 Gonad	14.1	0.48 (0~1.65)	16.9	37.2
	卵 Egg	5.7	0.27 (0~0.54)	3.8	8.4
	肌肉 Muscle	55.5	0.04 (0~0.14)	5.5	12.2
	鳃 Gill	3.0	0.05 (0~0.16)	0.4	0.8

1) 包括胃 Including stomach; 2) 不包括胃 Excluding stomach

(引自 Chen and Xie 2005a) (Cited from Chen and Xie 2005a)

如果设成人体重为 60 kg, 每天食用 300 g 虾肉, 则所分析虾肉样品的 31%超过 WHO 所建议的 TDI 标准。如果将虾作为整体食用的话, 从秀丽白虾和日本沼虾的 MC-LReq 平均日摄入量达 0.57 $\mu\text{g/kg BW}$  和 0.255  $\mu\text{g/kg BW}$ (高于 WHO 所建议 TDI 标准的 14.2 倍和 6.4 倍)。因此, 食用像巢湖这样被 MC 污染湖泊中的虾类的危险性不容忽视(Chen and Xie 2005a)。需要指出的是, 螯虾也是人们喜食的水产品(特别是性腺), 而性腺中的 MC 含量很高(为肌肉的 10 倍), 因此富营养水体中的螯虾(可能还有中华绒螯蟹)的食用安全性问题需予以关注。此外, 复合途径(食

用水产品、饮水、游泳等)对人类健康的危害也需要评估。

表 7-2 2003 年 6 月从巢湖采集的克氏原螯虾各组织的干重占总重量的百分比、各组织中的毒素含量( $\mu\text{g/g}$ )及所占的百分比

Table 7-2 MC contents ( $\mu\text{g/g}$ ) and percentage composition of dry weight and MC burden in various organs of the crayfish *Procambarus clarkii* collected from Lake Chaohu in June 2003

组织 Tissues	MC-RR	MC-LR	MC/( $\mu\text{g/g}$ )	干重 DW/%	毒素 Toxins <sup>1 <th>毒素 Toxins<sup>2 </sup></th></sup>	毒素 Toxins <sup>2 </sup>
胃 Stomach	4.18	5.79	9.97	6.7	62.8	
肠 Intestine	0.73	1.52	2.25	2.1	4.8	
肝胰腺 Hepatopancreas	0.00	0.08*	0.08*	2.7	0.2	0.7
性腺 Gonad	0.40	0.53	0.93	28.5	27.5	84.8
肌肉 Muscle	0.00	0.05	0.05	53.9	2.8	8.6
鳃 Gill	0.13	0.14	0.27	6.8	1.9	5.9

1) 包括胃 Including stomach; 2) 不包括胃 Excluding stomach

\*该值可能被低估, 因为仅采集到 0.08 g DW 的肝胰腺样品用于毒素分析, 而除肠道样品为 0.2 g DW 外, 其他所有组织样品的干重均为 0.5 g \*This value might be underestimated because only a pooled hepatopancreas sample of 0.08 g DW was collected for toxin analysis, whereas a 0.5 g DW sample for each of other organs was collected except intestinal sample (only 0.2 g DW) (引自 Chen and Xie 2005a) (Cited from Chen and Xie 2005a)

## 五、用 MMPB 法和甲醇萃取法测定珍宝蟹幼蟹组织中的 MC-LR 含量

为了获得 MC 在蟹体内与磷酸酶共价连接的证据, Williams 等(1997b)运用两种方法——MMPB(Lemieux 氧化-GC/MS 测定)法和甲醇萃取-PPase 法测定了野生的珍宝蟹幼蟹(英文名 Dungeness Crab, 学名 *Cancer magister*)体内的 MC-LR 含量。从加拿大不列颠哥伦比亚省的 Cypress 岛和 Maple 湾的鲑鱼网箱养殖厂用抄网(dip-net)采集珍宝蟹幼蟹, 分别取幼蟹 5.5 g 和 6.3 g。将幼蟹用甲醇萃取后, 用蛋白磷酸酶抑制法(PPIA)测定 MC-LR 含量; 另外用 Lemieux 氧化法( $\text{KMnO}_4 + \text{NaIO}_4$ )得到 MMPB, 再用 GC/MS 来测定, 进而计算 MC-LR 的含量。对珍宝蟹幼蟹组织中的 MC-LR 含量的测定结果差别巨大(表 7-3), Williams 等(1997b)认为, 这种巨大差异表明幼蟹组织中的 MC-LR 含量几乎都是以共价结合的形式而存在的。可是, 对 Maple 湾的样品所得的结果却正好相反, 即甲醇萃取-PPase 法测得的 MC-LR 含量为 6.27 ng/g 组织, 而用 Lemieux 氧化-GC/MS 法则没有测出 MC-LR 的存在。遗憾的是, 作者对上述矛盾的结果并没有给出合理的解释。

表 7-3 用 Lemieux 氧化-GC/MS 法和蛋白磷酸酶抑制法对珍宝蟹幼蟹组织中  
MC-LR 含量测定结果的比较

Table 7-3 Comparison of the Lemieux oxidation-GC/MS method and PPase  
assay for the analysis of microcystin-LR (MC-LR)  
in Dungenese crab larvae<sup>1)</sup>

样品 Sample	Lemieux 氧化-GC/MS 法的测定结果 Lemieux oxidation & GC/MS result ( $\mu\text{g}$ of MC-LR/g tissue)	甲醇萃取-PPase 法的测定结果 MeOH extraction & PPase assay result (ng of MC-LR/g tissue)
Cypress 岛幼蟹 Cypress Island crab larvae	84.4	5.52
Maple 湾幼蟹 Maple Bay crab larvae	nd	6.27

1) 为在代表性浓度范围标定的 3 个样品的平均值 $\pm$ S.D.; 1) Values are mean  $\pm$  SD obtained from triplicate calibrations within a representative concentration range. nd 表示未能检测出 not detectable

(引自 .Williams et al. 1997b) (Cited from Williams et al. 1997b)

# 第八章 药代动力学简介及 MC 在水生动物体内的药代动力学过程

迄今为止，关于 MC 在水生动物体内动力学过程的研究主要是通过数学图形描述 MC 含量在体内(组织中)的时间过程，而极少涉及数学模型。仅有的两例研究见于 Yokoyama 和 Park(2003)以及 Ozawa 等(2003)，他们通过向软体动物(淡水蚌和螺)反复投喂有毒微囊藻细胞，研究了 MC-LR 在肝胰腺中的累积和清除规律，依据药代动力学(pharmacokinetics, PK)的基本概念并假设 MC 的消除遵循一级动力学过程，对稳态浓度、消除期的消除速率和生物半衰期进行了估算。下面简单地介绍药代动力学的基本概念及基本动力学过程。

## 一、药代动力学简介

药代动力学是一门采用时间函数定量研究药物及其他外源性物质(xenobiotics)在体内的吸收(absorption)、分布(distribution)、代谢(metabolism)和排泄(excretion)规律的科学(桑国卫 2001, 刘昌孝 2004)。代谢和排泄合并起来称为药物的消除(elimination)。药代动力学在药理学、药理学及毒理学等领域得到广泛应用。

### 1. 药代动力学中的动力学过程

在药代动力学中，一般可用 3 种动力学模型来描述药物在体内的归属(吸收、分布和消除)：① 一级或线性动力学；② 零级和非线性动力学；③ Michaelis-Menten 或饱和动力学(刘昌孝和刘定永 1984, 桑国卫 2001)。

#### (1) 一级动力学(First-order kinetics)

绝大多数药物在体内的归属可用一级动力学模型来描述，即药物浓度的变化速率与药物浓度成比例(图 8-1)：

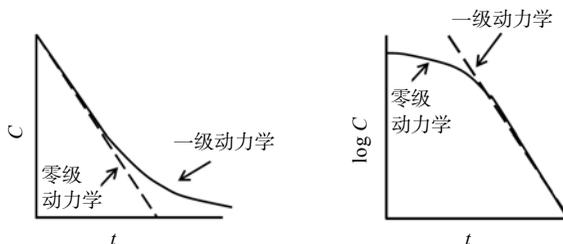


图 8-1 零级和一级动力学(引自 Koland 2005)

Fig. 8-1 Zero- and first-order kinetics (Cited from Koland 2005)

$$dc/dt = -kC \quad (8-1)$$

式中： $C$  为药物浓度； $k$  为一级速率常数； $t$  为时间；负号表示药物浓度随时间而降低。

## (2) 零级动力学(Zero-order kinetics)

如果药物浓度的变化速率恒定且与药物浓度无关，则称为零级动力学(图 8-1)：

$$dc/dt = -k_0 \quad (8-2)$$

式中： $k_0$  为零级速率常数。

## (3) Michaelis-Menten 动力学(Michaelis-Menten kinetics)

当药物浓度较高而出现饱和时，为受酶活力限制的动力学过程，浓度变化的速率可以用 Michaelis-Menten 模型描述：

$$dc/dt = -V_{\max}C/(K_m+C) \quad (8-3)$$

式中： $V_{\max}$  为过程中最大速率常数； $K_m$  为米氏(M-M)速率常数，单位为浓度。由式(8-3)可见，在低浓度( $C \ll K_m$ )时，公式可简化为  $dc/dt = -(V_{\max}/K_m)C$ ，即为一级过程；在高浓度( $K_m \ll C$ )时，公式可简化为  $dc/dt = -V_{\max}$ ，呈现零级过程(图 8-2)。

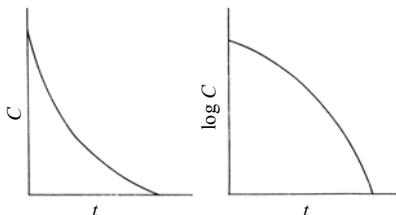


图 8-2 Michaelis-Menten 动力学(引自 桑国卫 2001)

Fig. 8-2 Michaelis-Menten kinetics (Cited from Sang 2001)

## 2. 房室模型

在临床药代动力学研究中，通常很难在药物的作用部位取样测定，而可测定血样中的药物浓度。由于血液循环是连接各组织与器官的纽带，是药物吸收、分布与清除的介质或载体，可将血液与一切能很快同血液循环建立起转运平衡的组织和器官(也即供血丰富的组织与器官)合并起来视为一个房室，称为中央室(central compartment)，而将其他供血贫乏的组织与器官合并起来称为周边室(peripheral compartment)(李芑 1996)。如果药物仅在各房室间转运，并不被代谢或排泄，称为封闭系统；如果药物可以从机体不可逆地被排泄或转运，则称为开放系统，绝大多数药物都属于开放系统。

药物进入体内后向全身分布，使药物在血液与各组织器官之间保持动态平衡，



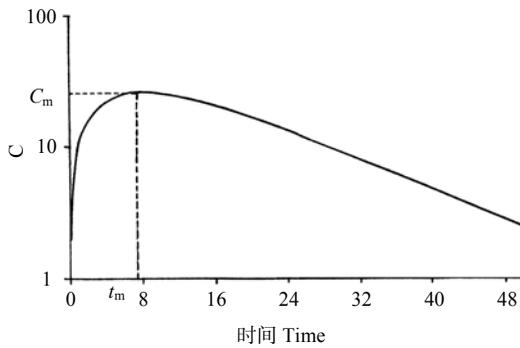


图 8-4 非静脉单次给药一室模型药时曲线(引自桑国卫 2001)

Fig. 8-4 Plot of drug concentration on a logarithmic scale versus time with an extravascular (non iv) dosing (Cited from Sang 2001)

式中： $dc/dt$  为药物浓度增加速率； $C$  为  $t$  时刻的药物浓度； $C_0$  为零时刻药物的初始浓度； $k_a$  为一级吸收速率常数。仅有吸收发生时药物浓度可表示为：

$$C = C_0[1 - e^{-k_a t}] \quad (8-5)$$

仅有消除发生时的药物浓度时间过程  $C = C_0 e^{-k_e t}$  ( $k_e$  为一级消除速率常数)，由于吸收和消除同时发生，药物浓度的净变化：

$$dc/dt = k_a [C_0 e^{-k_a t}] - k_e C_0 e^{-k_e t}$$

解方程得：

$$C = C_0 k_a / (k_a - k_e) [e^{-k_e t} - e^{-k_a t}] \quad (8-6)$$

如果  $k_a \gg k_e$ ，则  $k_a / (k_a - k_e)$  趋于 1，而  $e^{-k_a t}$  趋于零，此时，式(8-6)可简化为  $C = C_0 e^{-k_e t}$ 。当药物浓度达到峰值时药物的净转运等于零，即当  $t = t_{max}$  时， $dc/dt = 0$ ；由式(8-6)， $k_a e^{-k_a t_{max}} - k_e e^{-k_e t_{max}} = 0$ 。求解得

$$t_{max} = [\ln(k_a / k_e)] / (k_a - k_e) \quad (8-7)$$

即药物浓度达到峰值的时间仅取决于吸收与消除速率常数，而与剂量无关。将式(8-7)代入式(8-6)，可得峰值浓度：

$$C_{max} = C_0 e^{-k_e t_{max}} \quad (8-8)$$

#### 4. 药物的消除动力学

多数药物的消除遵循一级动力学过程，即药物浓度的下降速率可用式(8-1)表

示： $dc/dt = -k_e C$ 。组织中药物浓度的时间过程可描述如下：

$$C = C_0 e^{-k_e t} \quad (8-9)$$

式中： $C_0$ 为零时刻药物的初始浓度； $C$ 为时间 $t$ 时的药物浓度。由公式(8-9)得直线方程如下：

$$\log C = \log C_0 - (k_e/2.303)t \quad (8-10)$$

以 $\log C$ 对 $t$ 作图，则直线的截距为 $\log C_0$ ，斜率为 $k_e/2.303$ (图 8-5)。令 $t_1$ 和 $t_2$ 时的药物浓度为 $C_1$ 和 $C_2$ ，根据公式(8-10)：

$$\log C_1 = \log C_0 - (k_e/2.303)t_1; \log C_2 = \log C_0 - (k_e/2.303)t_2$$

由此求得： $k = 2.303[(\log C_1 - \log C_2)/(t_1 - t_2)]$ ；当 $C_2 = C_1/2$ 时， $(t_1 - t_2)$ 即为药物的消除半衰期，以 $t_{1/2}$ 表示：

$$t_{1/2} = 0.693/k_e$$

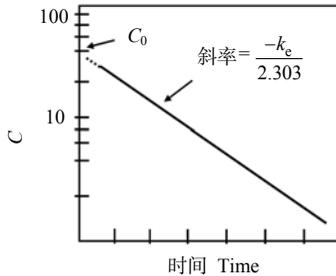


图 8-5 药物浓度-时间曲线半对数图(引自 Koland 2005)

Fig. 8-5 Plot of drug concentration on a logarithmic scale versus time (Cited from Koland 2005)

## 5. 稳态血药浓度

### (1) 静脉滴注给药与稳态血药浓度

以恒定速率 $R_0$ (如 mg/h)作静脉滴注，在时刻 $t$ ，体内药量为 $V_d C(t)$ 。达到稳态时，输入速率与消除速率相等：

$$R_0 = k_e V_d C_{ss} \quad (8-11)$$

式中： $V_d$ 为表观分布容积； $C_{ss}$ 为稳态血药浓度。为维持所要求浓度 $C_{ss}$ 所需的给药速率为：

$$R_0 = CL C_{ss} \quad (8-12)$$

式中： $CL$  为总清除率。

何谓稳态血药浓度？在滴注前，体内没有药物；随着滴注的进行，体内药量和血药浓度均逐渐增加；随着体内药量的增加，药物从体内的清除加快，但体内药量增加到一定程度后，药物从体内的消除速度正好等于滴入速率，体内药量保持恒定，血药浓度不再变化，此时的血药浓度称为稳态血药浓度或坪浓度  $C_{ss}$  (李莹 1996)。

稳态血药浓度  $C_{ss}=R_0/CL$ ，即稳态血药浓度由输入和消除速率所决定。假如恒速输注时流入速率恒定，则流出或消除速率决定了总的浓度变化速率及相应的时间过程，而消除速率则决定于消除速率常数  $k_e$ 。可以证明，静脉恒速输注时，在时间  $t$  时血药浓度达到稳态浓度的分数( $f_{ss}$ )与  $R_0$  无关：

$$f_{ss} = 1 - e^{-k_e t} \quad (8-13)$$

此即所谓血药浓度的“坪原理”(plateau principle)(桑国卫 2001)。图 8-6 为一种药物以 4 种不同速率输注时所达到的稳态血药浓度，可见稳态浓度的高低取决于输注速率，但达到稳态浓度的时间与输注速率无关，而只与  $k_e$  有关。

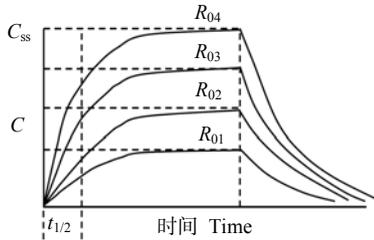


图 8-6 以不同速率恒速滴注的血药浓度-时间曲线。滴注速率  $R_{04}>R_{03}>R_{02}>R_{01}$ ，稳态浓度的高低取决于输注速率，但达到稳态的时间与输注速率无关(这取决于  $k_e$ )(引自 Koland 2005)

Fig. 8-6 Cartesian plot of plasma drug concentration versus time with different rates of constant i.v. infusion ( $R_{04}>R_{03}>R_{02}>R_{01}$ ).  $R_0$  changes  $C_{ss}$  but not rate of approach to steady state (this determined by  $k_e$ )(Cited from Koland 2005)

因为  $k_e=0.693/t_{1/2}$ ，代入式(8-13)可求得达到 50%、90%、95%、99% 及 99.9% 坪浓度所需要的时间分别为 1、3.32、4.32、6.64 和 10 个半衰期( $t_{1/2}$ )。一旦停止静脉输注，血药浓度通常即按类似于单次快速静脉推注后的时间过程下降(图 8-7)。

## (2) 多次给药与稳态血药浓度

大多数药物都需按一定疗程反复多次给药才能满足治疗需要。与一次性给药不同，多次给药有一个累积过程，即在前一次所给药物在体内尚未完全消除时，就要再次给药，导致血药浓度的峰值与谷值都比前一次高。由于药物的消除速度与体内药量成正比，随着体内药量的一次次升高，消除速度也不断加快，与静脉滴注一样，当高到一定程度时，每次给药间隔期间消除的药量正好等于给药剂量，

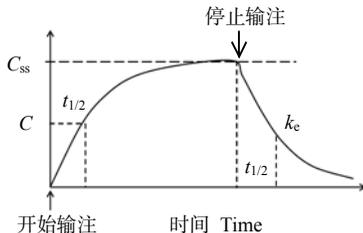


图 8-7 静脉恒速输注或周期性给药后的血药浓度-时间曲线(引自 Koland 2005)

Fig. 8-7 Cartesian plot of plasma drug concentration versus time with constant i.v. infusion or periodic dosing (Cited from Koland 2005)

此时即进入稳定状态，此后每次给药后的最高血药浓度与下次给药前的最低血药浓度在每个周期内保持不变(李菟 1996)。

静脉滴注的稳态与多次给药的稳态的区别在于：前者稳定在一个水平上(即稳态浓度就是一个浓度)，后者稳定地在一定范围内波动，所以有最高稳态浓度与最低稳态浓度之分(图 8-8)。

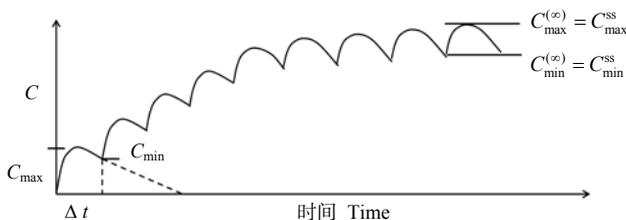


图 8-8 反复多次给药后血药浓度-时间曲线(引自 Koland 2005)

Fig. 8-8 Cartesian plot of plasma drug concentration versus time with multiple dosing (Cited from Koland 2005)

## 二、MC 在水生动物体内的动力学研究

对人体的药效动力学研究无需考虑人体温度的影响，因为人为恒温动物。由于鱼类、软体动物、虾蟹等水生动物为变温动物，因此已进行的有关 MC 的毒理学实验温度变化很大。

人体药效动力学研究主要依据血药浓度，而水生动物则有很大的不同：对较低等的水生动物(如软体动物、虾蟹等)，从未研究体液，而是研究各种器官(以肝胰腺最多)；而对鱼类等较高等的水生动物，既有血液的研究，又有各种器官的研究。由于 MC 的靶器官为肝脏(鱼类)或肝胰腺(螺、蚌、虾等)，而水生动物的肌肉为人们的主要摄食部位，迄今为止的研究以肝脏(肝胰腺)和肌肉为对象的居多。

# 1. MC 在水生动物体内动力学过程的首次模型研究

Yokoyama 和 Park(2003)在室内实验条件下，通过向圆顶珠蚌反复投喂有毒微囊藻细胞，研究了 MC-LR 在肝胰腺中的累积和清除规律。在摄取期，每隔两天投喂一次，水族箱中 MC-LR 的含量为(27±4.27) μg/L (15℃)和(50±7.52) μg/L(25℃)。他们假定 MC-LR 的消除遵循一级动力学过程，首次估算了 MC-LR 在蚌肝胰腺中的消除速率常数和半衰期(表 8-1)。消除速率常数  $k_e$  随实验温度的上升而增加，而半衰期  $t_{1/2}$  则随实验温度的上升而变短。

表 8-1 MC-LR 在圆顶珠蚌肝胰腺中清除实验的动力学参数

Table 8-1 Kinetic coefficients for the depuration experiments of MC-LR in the hepatopancreas of the bivalve *Unio douglasiae*

温度 Temperature	15℃	25℃
食物中毒素含量 Toxin in food/(μg MC-LR/L)	27±4.27	50±7.52
稳态浓度 Steady state concentration/(μg MC-LR/g DW)	130±11	250±40
消除速率常数 Depuration rate constant $k_e$ /day	0.142 (0.044)*	0.26 (0.046)**
生物半衰期 Biological half-time $t_{1/2}$ (day)	4.9	3.1
相关系数 Correlation coefficient ( $r^2$ )	0.39*	0.67**

\*  $P < 0.01$ ; \*\*  $P < 0.001$ (引自 Yokoyama and Park 2003)(Cited from Yokoyama and Park 2003)

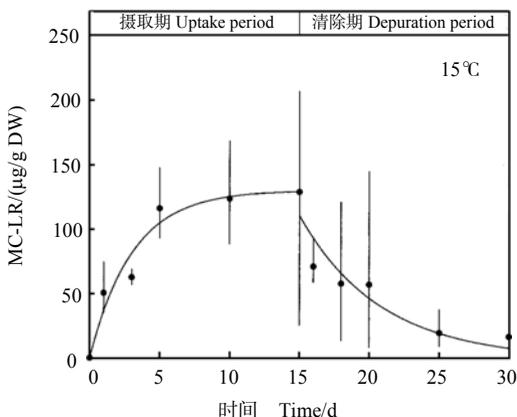


图 8-9 在 15℃ 的条件下，圆顶珠蚌肝胰腺对 MC-LR 的富集和清除规律，该蚌在前 15 天摄食有毒微囊藻细胞，然后在后 15 天转为摄食无毒硅藻 (引自 Yokoyama and Park 2003)

实心圆点表示 3 个样品的平均值；垂直线表示组织中 MC-LR 的最小值和最大值

Fig. 8-9 Uptake and depuration of MC-LR in the hepatopancreas of *Unio douglasiae* ingesting toxic *Microcystis* cells for the 15-day uptake experiment at 15℃. In the following 15-day depuration experiment (15℃), bivalves fed nontoxic diatom (Cited from Yokoyama and Park 2003)

Solid circles represent the average of three samples and vertical bars indicate maximum and minimum concentrations of MC-LR in the tissue

Yokoyama 和 Park(2003)认为由于在该实验中投饵为每两天进行一次,而不符合动力学模型条件,他们未估算吸收速率常数  $k_a$ 。但是,如果比较一下图 8-8 和图 8-9,则不难看出,MC-LR 在圆顶珠蚌肝胰腺中的吸收和消除动力学,与静脉恒速输注或周期性给药后的血药浓度-时间曲线模式图极为相似。因而可以假设,在该实验中,MC-LR 在蚌肝胰腺中的吸收遵循一级动力学。肝胰腺中 MC-LR 的稳态浓度( $C_{ss}$ )在 25℃约为 130  $\mu\text{g/g DW}$ ,在 15℃约为 250  $\mu\text{g/g DW}$ 。在该实验中,由于投喂量和温度均不同,因此  $C_{ss}$  的差异可能与二者均有关系。

## 2. 动力学参数的估算

Yokoyama 和 Park(2003)首次进行了 MC 在水生动物体内药代动力学参数的估算。同年, Ozawa 等(2003)在 19℃的温度条件下,估算了 MC-LR 在石田螺 *Sinotaia histrica* 肝胰腺中的消除速率常数和半衰期,分别为 0.0828 天和 8.4 天,与圆顶珠蚌相比,石田螺的消除速率明显要低,半衰期则明显要长。清除实验开始时石田螺肝胰腺中的 MC-LR 浓度( $C_0$ )高达 384  $\mu\text{g/g DM}$ (根据吸收动力学公式算得)(图 5-18)。

Ozawa 等(2003)首次用以下方程描述了 MC-LR 的吸收动力学过程:  $C=118.32 \ln(t) + 64.097$ ; 根据这一公式,随着时间的延长,肝胰腺中的 MC-LR 的含量  $C$  将会无限增大。很显然,由于石田螺肝胰腺中的 MC-LR 的半衰期较长(8.4 天),根据公式(8-13)算得 15 天的摄取实验仅达到了稳态浓度(坪浓度)的 70%。

然而,除此之外的所有研究都未计算 MC 的药代动力学参数,只能根据图形近似求得(表 8-2 和表 8-3)。有些研究仅研究了吸收过程,在周期性投喂且达到稳态浓度的情况下,可假设 MC-LR 的吸收和消除遵循一级动力学过程,现通过作图近似求得吸收半衰期。根据公式(8-13),吸收半衰期与消除半衰期相等,从而近似求得消除半衰期。

表 8-2 MC-LR 在水生动物体内摄取实验的动力学参数

Table 8-2 Kinetic coefficients for uptake experiments of MC in aquatic animals

种类 Species	投喂量 $R_0$ /( $\mu\text{g/L}$ )	稳态浓度 $C_{ss}$ /( $\mu\text{g/g DW}$ )	吸收半衰期 $t_{1/2}$ /d	温度 Tem. /℃	器官 Organ	文献 Reference
<b>双壳类 Bivalves</b>						
紫贻贝 <i>Mytilus galloprovincialis</i>	28.32 ( $\pm 13.67$ )	~9.5	~5	16	WB	Vasconcelos 1995
斑纹蚌 <i>Dreissena polymorpha</i>	11.78	~10.8	~2.5	12	WB	Pires et al. 2004
无齿蚌 <i>Anodonta cygnea</i>	40~60 (MC)	~68	~3	20	WB	Eriksson et al. 1989
圆顶珠蚌 <i>Unio douglasiae</i>	27 $\pm$ 4.27	130 $\pm$ 11		15	HP	Yokoyama and Park 2003
	50 $\pm$ 7.52	250 $\pm$ 40		25	HP	
	(MC-LR)					

WB: 整体 whole body; HP: 肝胰腺 hepatopancreas

表 8-3 MC-LR 在水生动物体内清除实验的动力学参数

Table 8-3 Kinetic coefficients for elimination experiments of MC in aquatic animals

种类 Species	$C_0$	$k_e$	消除半衰期 $t_{1/2}$	温度 Tem.	器官 Organ	文献 Reference
	/( $\mu\text{g/g DW}$ )		/d	/ $^{\circ}\text{C}$		
<b>双壳类 Bivalves</b>						
圆顶珠蚌 <i>Unio douglasiae</i>	130 $\pm$ 11	0.142	4.9	15	HP	Yokoyama and Park 2003
	(MC-LR)	(0.044)*				
	250 $\pm$ 40	0.26	3.1	25	HP	
	(MC-LR)	(0.046)**				
无齿蚌 <i>Anodonta grandis simpsoniana</i>	~4.9 <sup>#</sup>	nd	~5.5	20	VM	Prepas et al.1997
	(MC-LR)	nd	~4	20	Muscle	
	~2.7 <sup>#</sup>	nd	~2.5	20	Gill	
斑纹蚌 <i>Dreissena polymorpha</i>	6.2	nd	~2.5	12	WB	Pires et al. 2004
	(MC-LR)					
<b>螺 snail</b>						
石田螺 <i>Sinotaia histrica</i>	384	0.0828	8.4	19	HP	Ozawa et al. 2003

\*  $P < 0.01$ , \*\*  $P < 0.001$ ; WB: 整体 whole body; HP: 肝胰腺 hepatopancreas, VM: 内脏团 visceral mass; muscle: 肌肉; gill: 鳃; nd: 无数据 no data

# 设软体动物干湿比为 0.15 (Quinn et al. 2004) Assuming a dry to wet weight ratio of 0.15 for mussels (Quinn et al. 2004)

例如，根据图 5-7 得到图 8-10，可近似地估算在 16 $^{\circ}\text{C}$  的温度条件下，紫贻贝体内(整体)MC-LR 的  $C_{ss} \approx 9.5 \mu\text{g/g}$  和  $t_{1/2} \approx 5$  天。

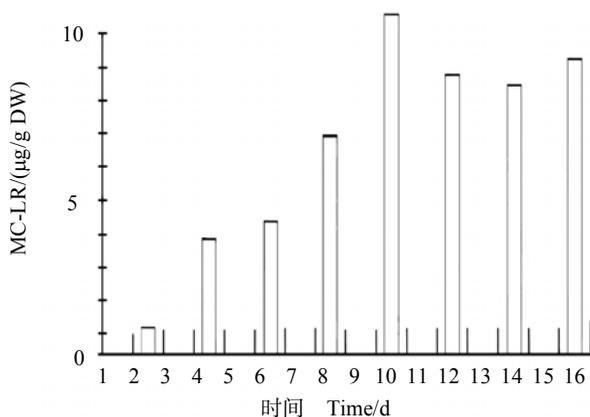


图 8-10 在 16 天摄取实验中，紫贻贝体内(整体)MC-LR 含量( $\mu\text{g/g}$ )的变化 (修改自 Vasconcelos 1995)

Fig. 8-10 Uptake of MC-LR ( $\mu\text{g/g}$ ) in the mussels (whole body) during the 16-day experiment (Modified from Vasconcelos 1995)

## 第九章 水生动物体内 MC 生物累积的一般模式

20 世纪六七十年代,人们发现有些有机化合物(如 DDT 和 PCB)易从环境中累积到鸟类和鱼类等生物体中,并通过食物网最终进入到包括人类在内的高等哺乳动物体内,因而引起人类社会的广泛关注。有机化合物在生物体内的积累过程主要包括两个方面:① 大气、水与生物体之间的直接分配;② 沿食物链的连续迁移过程。一般用生物浓缩(bioconcentration)描述生物体对水中溶解的有机化合物的积累过程,生物浓缩因子(bioconcentration factor, BCF)指化合物在生物体中的浓度与水中的浓度之比。生物体内的化合物浓度随食物链营养级的增加而增加的现象称为生物放大(biomagnification),生物放大因子(biomagnification factor, BMF)为食物链上高营养级生物体中化合物的浓度与其食物中的化合物的浓度的比值(Schwarzenbach et al. 2003)。当 BCF 或 BMF  $>1$  时,意味着该化合物在所研究的生物组织中进行了有效的富集。BCF 或 BMF 也可乘以 100,用百分数的形式表示。由于进入生物体的环境有机化合物主要积累在类脂物组织中,可对 BCF 用生物体内的类脂物含量进行标化。

环境中的有机污染物可以通过生物呼吸(如鳃)、摄食和皮肤吸收等途径进入水生动物体内,再通过血液或体液循环分散到动物体内的各个部位,被动物体内的各种器官和组织吸收富集,而动物各种器官和组织对某化合物的累积程度取决于该化合物在血液中的浓度以及动物器官和组织对该化合物的亲和性和代谢特征等(王连生 2004)。

### 一、MC 进入水生动物体内的主要途径

与人工合成的有机污染物不同,MC 来源于一些蓝藻的生物合成,因而是一种天然毒素。蓝藻细胞内的毒素有一部分可释放到水体中,因此,理论上 MC 可以溶解于水中的 MC(如通过鳃)和(或)通过含 MC 的有毒蓝藻(通过摄食)的形式进入水生动物体内。

MC 的化学特性可能对 MC 进入水生动物体内的途径有重要影响。虽然 MC-LR 的  $\log P_{ow}$  随 pH 的上升出现很大的下降,但整个 pH 范围内的值均较低:当 pH 从 1 上升到 10 时,  $\log P_{ow}$  从 2.18 下降到 -1.76(图 1-6)。由于 MC-LR 的  $\log P_{ow}$  值低以及 MC-LR 的相对分子质量较大(因而阻止其通过细胞膜的被动扩散),MC-LR 通过被动扩散直接进入生物体的量可能十分有限,而应该主要是随摄取的食物通过消化道进入动物体内(De Maagd et al. 1999)。

## 1. 高浓度 MC 溶液中的动物浸泡实验

软体动物浸泡在高浓度的 MC 溶液中，也未检测出体内的毒素含量。Prepas 等(1997)在水族箱中加入高达 51~55  $\mu\text{g/L}$  的 MC-LR 饲养无齿蚌(*Anodonta grandis simpsonian*)，3 天后，无齿蚌体内的 MC-LR 仍然低于检测限值( $\text{ng/g}$ )，表明与高含量溶解性 MC-LR 的接触并不能导致 MC-LR 在蚌体内累积。而当他们将无齿蚌置于含有毒蓝藻的湖水中(浮游植物的 MC-LR 含量 $<4 \mu\text{g/L}$ )，仅 4 天蚌体内的 MC-LR 就达到可检测的水平(13~21  $\text{ng/g}$ )。

当然，在湖泊中，胞外的 MC 含量一般远低于胞内 MC 含量，例如在 Suwa 湖，胞外的 MC 不到总 MC 含量的 2%(Yokoyama and Park 2002)。因此，溶解性的 MC 进入像软体动物这样的水生动物体内的可能性就更小。

## 2. 野外相关性分析和接触毒性实验

野外的研究数据表明，软体动物肝胰腺或体内的 MC 含量与溶解在湖水中的 MC 含量无相关性。Yokoyama 和 Park(2002)报道，在日本 Suwa 湖，圆顶珠蚌肝胰腺中的 MC 含量与颗粒悬浮物(SS)中的 MC( $\mu\text{g/g}$ )含量有很好的相关性( $R^2=0.72$ )(图 6-6)，而与溶解在湖水中的 MC 含量( $\mu\text{g/L}$ )无相关性( $R^2=0.01$ )。他们推测，MC 可能很难通过水生动物的上皮(epithelia)积累，双壳类对 MC 的积累可能主要是通过口腔进食而不是通过鳃(gill)从水中摄取。Zurawell 等(1999)研究了加拿大 7 个湖泊中的 3 种螺体内的 MC 含量，发现螺体内的 MC-LR 的含量与浮游植物胞内 MC 含量均有显著的正相关，而与水中溶解的 MC-LR 含量无关。当然，一般来说，湖泊中的胞外 MC 浓度远远低于胞内，可能因此也加大了胞外 MC 数据的变异。

此外，MC-LR 对甲壳动物(如卤虫)的接触毒性(contact toxicity)很低。Delaney 和 Milkins (1995)在 30℃ 的温度条件下，分别将卤虫幼虫浸泡在浓度为 0  $\mu\text{g/mL}$ 、0.5  $\mu\text{g/mL}$ 、2  $\mu\text{g/mL}$ 、10  $\mu\text{g/mL}$ 、20  $\mu\text{g/mL}$ 、40  $\mu\text{g/mL}$  的微囊藻毒素溶液中，得到 MC-LR 对卤虫的 24 h  $\text{LC}_{50}$  为 3.75  $\mu\text{g/mL}$ 。在该实验中，溶解性 MC-LR 浓度高达 0.5~40  $\text{mg/L}$ ，这在自然的水体中是很难达到的水平。Metcalf 等(2002)在室温条件下，将卤虫幼虫浸泡在各种不同浓度的 MC-LR 溶液中，获得 24 h、40 h、48 h、64 h 和 72 h 的  $\text{LC}_{50}$  分别为 4.58  $\mu\text{g/mL}$ 、3.00  $\mu\text{g/mL}$ 、2.80  $\mu\text{g/mL}$ 、1.19  $\mu\text{g/mL}$  和 0.85  $\mu\text{g/mL}$ 。这些研究结果表明，MC-LR 对卤虫的接触毒性很低，这可能也间接地说明，水中溶解性 MC 很难通过细胞的被动扩散进入卤虫幼虫体内。

Tencalla 等(1994)报道，在水族箱中，每升水中含 8~16  $\text{mg}$  的铜绿微囊藻藻粉对虹鳟无毒害作用，而用 1440  $\text{mg/kg BW}$  的铜绿微囊藻藻粉(相当于 6.6  $\text{mg MC/kg BW}$ )灌喂时，虹鳟在 96 h 内死亡。因此，他们认为，虹鳟对 MC 的摄取主要是通

## 二、MC 在水生动物器官中的分布规律

肝脏/肝胰腺是 MC 的重要靶器官, 因此其中累积的 MC 量也是关注的焦点之一。不同无脊椎动物(蚌、螺、虾)肝胰腺中累积的 MC 与整体的 MC 之比( $H_{mc}/T_{mc}$ )相当稳定(40%~55.4%), 尽管  $D_{mc}/H_{mc}$ (消化道与肝胰腺 MC 之比)、 $D_{max}$ (消化道 MC 含量最大值)和  $H_{max}$ (肝胰腺 MC 含量最大值)变动很大(分别为 0.18~5.50  $\mu\text{g/g DW}$ 、0.38~20.65  $\mu\text{g/g DW}$  和 1.67~38.48  $\mu\text{g/g DW}$ ), 肝胰腺与体重之比的变化也很大(2.9%~14.2%)(表 9-1)。这表明, 不同无脊椎动物肝胰腺中的 MC 负荷(burden)十分相似, 尽管在摄食模式、生理结构、毒素吸收和清除动力学特征方面存在很大差异(Chen and Xie 2006)。而鱼类肝脏中的 MC 负荷却远比无脊椎动物的低, 例如, 在巢湖, 7 种鱼类肝脏中累积的 MC 占整体 MC 的比例仅为 1.2%~15.9%(平均为 9.6%), 而肌肉和血液中的平均含量分别高达 48.7%和 39.9%(表 9-2)。

表 9-1 各种无脊椎动物消化道、肝胰腺和整体中 MC 的平均浓度(分别用  $D_{mc}$ 、 $H_{mc}$  和  $T_{mc}$  表示)( $\mu\text{g/g DW}$ )的比较。 $H_{wt}$  和  $T_{wt}$  分别表示肝胰腺重量和体重,  $D_{max}$  和  $H_{max}$  分别表示消化道和肝胰腺中 MC 的最大值( $\mu\text{g/g DW}$ )

Table 9-1 A comparison of the mean MC content ( $\mu\text{g/g DW}$ ) in the digestive tract ( $D_{mc}$ ), hepatopancreas ( $H_{mc}$ ) and total body ( $T_{mc}$ ) in various aquatic invertebrates.  $H_{wt}$  and  $T_{wt}$  denote dry weights of hepatopancreas and total body, respectively; and  $D_{max}$  and  $H_{max}$  denote maximum MC contents ( $\mu\text{g/g DW}$ ) in the digestive tracts and the hepatopancreas, respectively

种类 Species	平均体长 BL/mm	平均体重 BW/g	$D_{mc}/H_{mc}$ ( $D_{max}$ )	$H_{mc}$ ( $H_{max}$ )	$H_{mc}/T_{mc}$ * /%	$H_{wt}/T_{wt}$ * /%	文献 Reference
<b>双壳类 Bivalves</b>							
河蚬 <i>Corbicula fluminea</i>	21±1.0	7.1±2.1	0.18(0.38)	1.07(4.37)	42.2	6.3	†Chen and Xie 2006
背瘤丽蚌 <i>Lamprotula leai</i>	100±6.5	59.6±7.3	0.22(2.52)	4.25(13.23)	48.8	6.1	†Chen and Xie 2005 b
三角帆蚌 <i>Hyriopsis cumingii</i>	190±12.4	89.3±12.5	1.12(20.65)	3.42(12.5)	55.4	8.3	†Chen and Xie 2005 b
褶纹冠蚌 <i>Cristaria plicata</i>	240±13.5	114.9±27.8	0.29(5.64)	5.79(38.48)	53.9	2.9	†Chen and Xie 2005 b
背角无齿蚌 <i>Anodonta woodiana</i>	130±8.4	77.4±13.9	1.41(7.88)	1.54(5.96)	45.5	5.1	†Chen and Xie 2005 b
无齿蚌 <sup>a</sup> <i>Anodonta cygnea</i>	90±20	—	—	130	40.0 <sup>b</sup>	3.5 <sup>b</sup>	<sup>#</sup> Eriksson et al. 1989
圆顶珠蚌 <sup>a</sup> <i>Unio douglasiae</i>	—	—	0.48(1.31)	2.72	—	—	<sup>#</sup> Watanabe et al. 1997
<b>螺 Snails</b>							
铜锈环棱螺	21.6±3.9	4.3±0.56	0.41(4.54)	4.14 (7.42)	46.7	7.0	†Chen et al. 2005;

种类 Species	平均体长 BL/mm	平均体重 BW/g	$D_{mc}/H_{mc}$ ( $D_{max}$ )	$H_{mc}$ ( $H_{max}$ )	$H_{mc}/T_{mc}$ * /%	$H_{wt}/T_{wt}$ * /%	文献 Reference
<i>Bellamyia aeruginosa</i>							unpublished data
石田螺 <i>Sinotaia histrica</i>	—	—	14.0 (19.5)	0.53 (3.2)	—	—	†Ozawa et al. 2003
<b>虾 Shrimps</b>							
秀丽白虾 <i>Palaemon modestus</i>	64.0±4.5	4.7±0.63	1.06 (9.83)	4.29(8.40)	41.0	6.3	†Chen and Xie 2005a
日本沼虾 <i>Macrobrachium nipponensis</i>	66.5±3.5	5.8±0.68	5.50 (12.42)	0.53(1.67)	41.4	14.2	†Chen and Xie 2005a

\* 不包括肠道 excluding intestine; †野外研究 field study; #实验室研究 laboratory experiment; a 包括消化 including digestive tract; b 仅测定了一个样品 only one sample was measured; —无数据 no data  
(修改自 Chen and Xie 2006)(Modified from Chen and Xie 2006)

表 9-2 巢湖 7 种鱼类各器官中的 MC(RR+LR)含量的百分比

Table 9-2 Percentage composition of MC (RR+LR) amount in various organs of 8 fishes from Lake Chaohu

种类 Species	体重	肌肉	肝脏	肾脏	血液	胆囊
	Body weight/g	Muscle /%	Liver /%	Kidney /%	Blood/%	Bile/%
鲢 <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	950	72.8	5.5	3.4	18.3	0.0
鳊 <i>Parabramis pekinensis</i>	470	36.2	6.2	0.8	56.7	0.0
鲫 <i>Carassius auratus</i>	88.1	40.5	1.2	0.44	57.7	0.0
鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	725	35.5	11.4	4.2	48.9	0.0
黄颡鱼 <i>Pseudobagrus fulvidraco</i>	75	48.0	15.3	—	36.7	0.0
红鳍原鲌 <i>Culter erythropterus</i>	105	38.4	12.0	1.5	48.1	0.0
翘嘴鲌 <i>Culter ilishaeformis</i>	650	69.8	15.9	1.2	13.0	0.0
平均 Mean	437.6	48.7	9.6	1.9	39.9	0.0

(引自谢丽强未发表资料)(Cited from unpublished data of Xie LQ)

### 三、动物体内 MC 与食物中 MC 含量的关系

前已述及，食物是 MC 进入水生动物体内的主要途径。但是，如何建立食物中 MC 含量与水生动物体内 MC 含量的关系，一直是野外研究的焦点之一。由于动物体内的毒素测定技术复杂而昂贵，如果能建立水中浮游植物体内 MC 含量与动物体内 MC 含量的关系，在风险预测上将具有实际意义。但由于动物的摄食机制复杂，许多研究则直接测定消化道中的 MC 含量，探讨和其他器官中 MC 含量的关系。

由于肝胰腺是动物累积 MC 的主要器官，因此考虑肝胰腺与食物中 MC 含量的关系较多；在个别研究中，可能由于解剖困难的原因，仅测定了动物整体或肌

肉中的 MC 含量。这主要包括了两类研究：一类研究水生动物肝/肝胰腺与消化道中 MC 含量的相关关系；另一类研究水生动物肝/肝胰腺(或整体或肌肉)与浮游植物胞内 MC 含量的相关关系。此外，由于肝脏是 MC 的靶器官，而肌肉则是人们主要的食用器官，二者之间的关系也是许多研究关注的焦点之一。

## 1. 消化道中 MC 含量与肝胰腺中 MC 含量的相关关系

在巢湖，铜锈环棱螺(*Bellamyia aeruginosa*)消化道中的 MC 与肝胰腺中的 MC 含量存在一定的正相关性( $r = 0.64$ ,  $P = 0.173$ )(Chen et al. 2005)。

而同样在巢湖，日本沼虾(*Macrobrachium nipponensis*)和秀丽白虾(*Palaemon modestus*)胃中的 MC 与其肝胰腺中的 MC 含量之间却无相关性(Chen and Xie 2005a)。

在太湖梅梁湾，4 种蚌壳(背角无齿蚌 *Anodonta woodiana*, 三角帆蚌 *Hyriopsis cumingii*, 褶纹冠蚌 *Cristaria plicata* 和背瘤丽蚌 *Lamprotula leai*)消化道中的 MC 与肝胰腺中的 MC 含量之间存在显著的正相关性( $r=0.75\sim 0.97$ ,  $P<0.05$ )，除背瘤丽蚌的消化道中的 MC 与其内脏团(visceral mass)的 MC 有显著的相关性( $r=0.86$ )外，4 种蚌壳消化道中的 MC 与其他器官(内脏团、鳃、足及其他部分)中的 MC 均无显著相关性(Chen et al. 2005)。

而同样在太湖梅梁湾，鳙鱼(*Aristichthys nobilis*)肠道中的 MC 与其他器官和组织(肝脏、肾脏、脾、胆囊、鳃、血液和肌肉)中的 MC 含量之间均无显著相关性(Chen et al. 2006)。

很显然，水生动物消化道中 MC 含量与肝脏/肝胰腺中 MC 含量之间的关系十分复杂多样，有时显著，有时则异。动物消化道中的 MC 含量的测定受到诸多因素的影响，例如，取样时食物的消化程度、食物的异质性等(Chen et al. 2005)。又如，一些动物(如软体动物)的内部结构十分复杂，器官界定十分困难(有时甚至容易混淆)。此外，一些螺类(如铜锈环棱螺)和虾类(如日本沼虾和秀丽白虾)的肠道则十分纤细，肠壁在整个肠管重量中的比重可能相当大。

食物消化程度的复杂性可以通过比较消化道不同部位的差异来认识。Chen 等(2006)研究了太湖梅梁湾中鳙鱼肠道各段(前肠、中肠和后肠)肠含物中 MC 含量( $\mu\text{g/g DW}$ )的变化规律，发现前肠(平均 16.57) $<$ 中肠(平均 41.57) $<$ 后肠(平均 124.65)，也就是说，MC 含量随食物从前肠输送到后肠的消化过程中反而大幅增加(相差达 7.5 倍之多)。推测可能有两种原因导致了这种差异的出现：其一，所采集的鱼类的前肠(通常含有较多的消化酶)的消化程度一般较后肠为高；其二，鳙鱼仅部分消化摄入的藻类，因此，在后肠中往往有大量完好的蓝藻细胞存在，从而出现很高的 MC 含量。

肠含物和肠壁的 MC 含量也存在巨大差异。鳙鱼前肠壁、中肠壁和后肠壁的平均 MC 含量分别为 0.18  $\mu\text{g/g DW}$ 、1.22  $\mu\text{g/g DW}$  和 0.31  $\mu\text{g/g DW}$ ，分别仅为相应肠含物 MC 含量的 1.1%、2.9%和 0.25%(Chen et al. 2006)。可以推测，如果不区

分肠含物和肠壁，当肠壁质量相对较大(如当所采的动物肠含物很少，或者随着消化的进行，肠前段的食物逐渐被输送到肠后段)时，所取肠管的 MC 含量就会偏低；此外，如果某种动物的肠管很纤细(如铜锈环棱螺、日本沼虾和秀丽白虾)，肠含物相对较少，也会导致肠管的 MC 含量偏低。这些也可能是导致肠管中的 MC 含量与动物体内(如肝胰腺)MC 含量相关关系不稳定的重要原因之一。

## 2. 浮游植物细胞内 MC 含量与动物体内 MC 含量的相关关系

在加拿大的 7 个湖泊中，3 种螺(*Lymnaea stagnalis*、*Helisoma trivolvis* 和 *Physa gyrina*)体内(整体)的 MC-LR 含量与浮游植物胞内 MC 含量(数据均经过对数转换)有显著的正相关，其中 *L. stagnalis* 和 *P. gyrina* 体内的 MC 含量(数据经过对数转换)还与微囊藻在浮游植物中的相对丰度(数据经过反正弦平方根转换)显著相关(Zurawel et al. 1999)。

在日本的 Suwa 湖，3 种蚌——背角无齿蚌 *Anodonta woodiana*、褶纹冠蚌 *Cristaria plicata* 和圆顶珠蚌 *Unio douglasiae* 肝胰腺中的 MC 含量最大值分别为 12.6  $\mu\text{g/g DW}$ 、297  $\mu\text{g/g DW}$  和 420  $\mu\text{g/g DW}$ ，其中含量最高的圆顶珠蚌肝胰腺中的 MC 含量与 SS 中的 MC 含量有显著的相关性( $R^2=0.72$ )(Yokoyama and Park 2002)。

在巴西的 Sepetiba 湾中，红胸罗非鱼(*Tilapia rendalli*)肌肉中的 MC 与悬浮物中的 MC 之间存在显著的相关性( $r=0.96$ ,  $P<0.05$ )(Magalhaes et al. 2003)。

从这些结果可以看出，浮游植物细胞内 MC 含量与动物体内(肝胰腺、肌肉或整体)的 MC 含量一般都有较好的相关关系。

## 3. 肝脏/肝胰腺与肌肉中的 MC 含量的相关关系

在太湖梅梁湾，鳊鱼肝脏中的 MC 与肌肉中的 MC 含量有显著的相关性( $r=0.94$ ,  $P<0.01$ )，肝脏和肌肉中 MC 的年平均含量分别为 0.374  $\mu\text{g/g DW}$  和 0.124  $\mu\text{g/g DW}$ ，(Chen et al. 2006)。

在埃及一鱼池中，尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)肝脏中的 MC 与肌肉中的 MC 含量相关显著( $r=0.96$ )(Mohamed et al. 2003)。

# 四、MC 在浮游植物和碎屑食性水生动物体内的生物累积

由于肝脏/肝胰腺是 MC 累积和作用的靶器官，以下主要考虑食物中 MC 在肝脏/肝胰腺中的生物累积。比较某种动物在自然界中或实验条件下食物中的含量与其肝脏/肝胰腺中的 MC 含量，是获取生物累积的最直接的手段。

水体中的浮游蓝藻是水生动物体内 MC 的直接或间接的来源，其中滤食性动物直接从水体中悬浮的有毒蓝藻中通过摄食直接摄取 MC。除极少数的肉食性种

类以外，双壳类(如贻贝、蚌)均为滤食性动物，依靠鳃纤毛的运动形成水流，滤食水中的食物(主要是藻类、浮游动物、有机碎屑等)，因而常将浮游植物作为主要食物。滤食性鱼类，如鲢、鳙也直接以悬浮的藻类为食。而螺的食物主要来自水中的各种基质表面的附着生物(如表层沉积物中的藻类、有机碎屑和泥沙等)，因此如果用浮游植物胞内的 MC 含量作为螺食物中的 MC 含量将会造成很大偏差。

## 1. 室内实验

在室内实验中，在一定的温度条件下，可求得以一定的投喂量连续投喂一段时间后，肝脏/肝胰腺中的 MC 稳态浓度与食物中的 MC 含量之比值。这种研究通常在很高的 MC 投喂量的情况下进行(Yokoyama and Park 2003, Ozawa et al. 2003, Xie et al. 2004)，有的研究则包括了很低的投喂浓度(Amorim 1997)。

### (1) 肝脏或肝胰腺

Yokoyama 和 Park(2003)在两种温度条件(15℃、25℃)下，向圆顶珠蚌投喂有毒微囊藻，水族箱中平均藻类浓度分别为 14.5 mg DW/L 和 15.0 mg DW/L，平均 MC-LR 浓度分别为(27±4.27) μg/L 和(50±7.52) μg/L。因此，可推算在该实验中，所投喂的微囊藻细胞内 MC-LR 的平均含量约为 1.86 mg/g DW 和 3.33 mg/g DW。由于该实验中圆顶珠蚌肝胰腺中 MC-LR 的稳态浓度在 25℃约为 0.13 mg/g DW，在 15℃约为 0.25 mg/g DW，因此计算得到在该实验中的两种温度条件下，圆顶珠蚌肝胰腺对 MC 的积累分别为所投喂的微囊藻细胞内 MC-LR 含量的 6.98%和 7.51%。

Ozawa 等(2003)在 19℃的温度条件下，向石田螺 *Sinotaia histrica* 投喂新鲜的有毒微囊藻，水族箱中平均 MC-LR 浓度为(20.1±6.1) μg/L。由于他们没有以生物量的形式给出藻类浓度，因此无法估算所投喂微囊藻细胞内 MC-LR 的平均含量。取 Yokoyama 和 Park(2003)实验中两种温度条件(15℃、25℃)下微囊藻细胞内 MC-LR 含量的中值(2.60 mg/g DW)，再根据螺肝胰腺中 MC-LR 的稳态浓度(0.384 mg/g DW)(第八章)，推算出 *S. histrica* 肝胰腺对 MC-LR 的累积为所投喂的微囊藻细胞内 MC-LR 含量的 14.8%。

### (2) 整体

Pires 等(2004)在 12℃的温度条件下，向斑纹蚌投喂有毒微囊藻，水族箱中平均 MC-LR 浓度为 11.78 μg/L，投喂的微囊藻细胞内 MC-LR 的含量为 3.13 mg/g DW。再根据斑纹蚌体内 MC-LR 的稳态浓度(0.011 mg/g DW)，推算出斑纹蚌整体对 MC-LR 的积累为所投喂的微囊藻细胞内 MC-LR 含量的 0.35%。

### (3) 其他

Amorim 和 Vasconcelos (1999)报道，软体动物对 MC 的摄取率与有毒微囊藻的密度成正比，如在实验条件下，当微囊藻细胞密度为 10 个/mL、10<sup>1</sup> 个/mL、10<sup>2</sup> 个/mL 时，连续投喂 8 天，紫贻贝体内的毒素含量也未达到可检测的水平(Amorim

1997), 而当微囊藻细胞密度为  $10^5$  个/mL 时, 紫贻贝 *Mytilus galloprovincialis* 对 MC-LR 的摄取率为 21.4%~54.8%(Vasconcelos 1995)。

## 2. 野外研究

与室内实验相比, 野外的情况更加复杂, 食物种类、MC 含量等不断变化, 再加上通常以月为单位的采样间隔, 动物体内 MC 的稳态浓度可能在不断变化。通过 SS 中的 MC 含量与动物体内 MC 含量的直线回归关系, 仍然可以得到有价值的结果, 但这样的研究极少。

### (1) 鱼类

在埃及一鱼池中, 藻类生物量达 6.7 g DW/L, 其 MC 含量为 1.12 mg/g DW, 尼罗罗非鱼肝脏中 MC 含量的最高值(0.532  $\mu\text{g/g}$  WW 或 2.66  $\mu\text{g/g}$  DW)(Mohamed et al. 2003)。因此计算得到, 尼罗罗非鱼肝脏对 MC 的累积仅为所摄取的微囊藻细胞内 MC 含量的 0.2%。

### (2) 蚌类

在日本 Suwa 湖, Yokoyama 和 Park(2002)研究了 SS 中的 MC 含量与圆顶珠蚌肝胰腺中 MC 含量的直线回归关系。根据回归直线的斜率(0.28), 可得出圆顶珠蚌肝胰腺对 MC 的累积达到浮游植物 MC 含量的 28%。在该研究中, SS 和圆顶珠蚌肝胰腺中 MC 含量的最大值分别为 1.09 mg/g DW 和 0.42 mg/g DW。

Prepas 等(1997)报道, 蚌可在环境中毒素含量极低的情况下进行生物富集: 在 Coal 湖, 浮游植物细胞体内的毒素含量在检测限以下( $<5\text{ng/L}$ ), 无齿蚌 *Anodonta grandis simpsoniana* 经过 28 天的累积, 其体内(蚌整体)的毒素含量达到可检测的水平[( $24\pm 7$ )ng/g]; 在 Little Beaver 湖和 Driedmeat 湖, MC-LR 平均含量分别为 ( $1.26\pm 0.33$ )  $\mu\text{g/L}$  和 ( $3.94\pm 1.35$ )  $\mu\text{g/L}$ , 经过 28 天的累积, 无齿蚌体内的毒素含量达( $100\pm 12$ ) ng/L 和 ( $776\pm 215$ ) ng/g。水生动物是否均可在食物中的毒素含量极低的情况下进行生物富集, 还需要更多的研究证据。

### (3) 螺类

而对像螺类这样不直接滤食浮游植物的动物来说, 定量研究肝胰腺与食物(通常是肠管)中 MC 的关系极为困难。在日本的琵琶湖, 石田螺 *Sinotaia histrica* 在 10 月份的样品中, 其肝胰腺中的 MC 含量为肠道中 MC 含量的 1/6, 而在 7~9 月份, 肠道中的 MC 含量达 2.59~4.82  $\mu\text{g/g}$  DW, 而肝胰腺中的 MC 含量几乎检测不出(Ozawa et al. 2003)。在巢湖, 虽然铜锈环棱螺肝胰腺与消化道的 MC 含量有正相关关系, 肝胰腺中的 MC 平均含量(4.14  $\mu\text{g/g}$  DW)显著高于消化道(1.693  $\mu\text{g/g}$  DW), 而从水面收集的蓝藻水华中的 MC 含量达 240  $\mu\text{g/g}$  DW(Chen et al. 2005)。造成巢湖铜锈环棱螺消化道中 MC 含量低的原因一方面可能由于巢湖的泥沙含量高而使螺摄取的食物中含有大量泥沙, 另一方面螺的肠道十分纤细, 导致肠管中的 MC 含量偏低。

## 五、MC 在不同营养级水生动物体内的生物放大作用

一些持久性有机化合物的生物放大作用明显，例如，在安大略湖，PCB52(2,2',5,5'-四氯联苯)在水中的浓度仅为 0.00 006  $\mu\text{g/L}$ ，在浮游生物体内上升到 12  $\mu\text{g/kg}$ ，在以浮游生物为食的虾体内再上升到 18  $\mu\text{g/kg}$ ，在以虾为食的小胡瓜鱼和大胡瓜鱼体内分别上升到 40  $\mu\text{g/kg}$  和 90  $\mu\text{g/kg}$ ，而在以胡瓜鱼为食的鲑鱼和大马哈鱼体内则高达 310  $\mu\text{g/kg}$  (Oliver and Nimi 1988)。自 20 世纪 60 年代以来，有关持久性有机化合物在生态系统中的生物放大作用引起科学界和社会的高度关注，并已积累了大量的科学研究资料。

而有关 MC 是否在水生态系统中具有生物放大作用的研究极少(Ibelings et al. 2005, Xie et al. 2005)，本节介绍荷兰 IJsselmeer 湖的有关研究，并根据已发表和未发表的数据对美国的 Erie 湖和我国巢湖中 MC 的生物放大因子进行了粗略的估算。

### 1. 荷兰 IJsselmeer 湖的研究

Ibelings 等(2005)研究了荷兰 IJsselmeer 湖食物网主要成分中的 MC 含量及生物放大因子(BMF)。生态系统中无其他组分中的 MC 含量超过产生毒素的浮游植物(悬浮物)中的 MC 含量(图 9-1)。相对于悬浮物的  $\text{BMF} = \text{动物体内 MC} / \text{悬浮物 MC} \times 100$ ，相对于饵料的  $\text{BMF} = \text{动物体内 MC} / \text{饵料 MC} \times 100$ 。浮游动物和蚌的饵料为悬浮物，胡瓜鱼的饵料为浮游动物，河鲈的饵料为胡瓜鱼，欧洲鲈的饵料为蚌的伪粪便；依据实验结果，蚌伪粪便中的 MC 含量约为蚌体中 MC 含量的 7.5

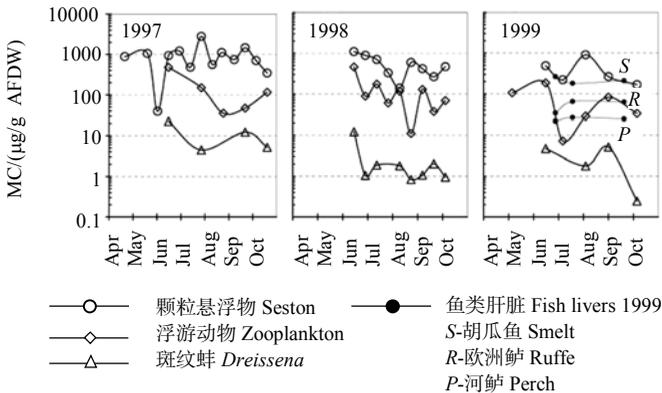


图 9-1 在连续 3 个夏季(1997~1999 年，仅 1999 年采集了鱼的样品)，浮游植物、浮游动物、蚌和 3 种鱼类的肝脏中的 MC 含量。数据为 6 个采样点的平均值(引自 Ibelings et al. 2005)  
 Fig. 9-1 Concentration of MC in phytoplankton, zooplankton, mussels, and the livers of three fish species during three consecutive summers (1997~1999; fish 1999 only). Data averaged over all six sampling stations (Cited from Ibelings et al. 2005)

倍。由于双壳类和鱼肝脏的灰分含量很低，干重和无灰干重大致位于同样的范围。以干重为基础计算的 BMF 略大于以无灰干重计算的 BMF(主要是由于悬浮物的灰分含量高于动物组织)(表 9-3)。

表 9-3 1999 年夏季，荷兰 IJsselmeer 湖中不同食物网成分中的平均 MC(MC-LReq) 含量和生物放大因子(BMF)

Table 9-3 Average MC (MC-LReq) content of different food web compartments and biomagnification factor (BMF) in the summer of 1999 in Lake IJsselmeer, Netherlands.

种类 Species	µg/g AFDW	µg/g DW	# 生物放大因子 # BMF		\$ 生物放大因子 \$ BMF	
			悬浮物 Seston	饵料 Diet	悬浮物 Seston	饵料 Diet
<b>悬浮物 Seston</b>	407.5(42~1089)	271.7(28~726)				
<b>滤食性动物 Filter feeder</b>						
浮游动物 Zooplankton	76(0~408)	68.4(0~367.2)	18.7	18.7	25	25
斑纹蚌 <i>Dreissena polymorpha</i>	6(0~30)	6(0~30)	1.5	1.5	2.2	2.2
<b>食浮游动物鱼类 Zooplanktivorous fish</b>						
胡瓜鱼肝脏 liver of smelt ( <i>Osmerus eperlanus</i> )	218(59~874)	218(59~874)	53.5	286	80.0	319
<b>食底栖动物鱼类 Benthivorous fish</b>						
一种欧洲鲈的肝脏 liver of ruffe ( <i>Gymnocephalus cernua</i> )	54(9~194)	54(9~194)	13.3	120	19.9	120
<b>凶猛性鱼类 Piscivorous fish</b>						
河鲈肝脏 liver of perch ( <i>Perca fluviatilis</i> )	24(17~51)	24(17~51)	5.9	11.0	8.8	11.0

#表示以干重为基础 is based on DW; \$表示以无灰干重为基础 is based on AFDW (修改自 Ibelings et al. 2005) (Modified from Ibelings et al. 2005)

括号中的数据表示范围，水柱中悬浮物的 MC 浓度为 3.65 (0.21~10) µg/L。MC 的检测方法为 HPLC

Bracketed figures are ranges. MC in seston of the water column was 3.65 (0.21~10) µg/L. MC was measured using HPLC

值得注意的是，在该研究中，胡瓜鱼肝脏中的 MC 含量约为其饵料(浮游动物)的 3 倍。Ibelings 等(2005)认为，由于鱼类仅测定了肝脏中的 MC 含量，因此无法与整体(如浮游动物、蚌)的 MC 值比较。的确，肝脏是 MC 的主要富集器官(Williams et al. 1997a)，且硬骨鱼类的肝脏一般仅占体重的 1%~2%(田村 1977)，要推测鱼类整体的 MC 含量应该使用准确的校正系数。

很显然，在 IJsselmeer 湖，同为滤食浮游植物，浮游动物体内的 MC 含量远高于蚌。此外，食浮游动物的胡瓜鱼肝脏中的 MC 含量远高于食底栖动物的欧洲鲈和凶猛性河鲈。Ibelings 等(2005)认为 MC 在 IJsselmeer 湖生态系统中不存在生物放大作用。

## 2. 美国 Erie 湖的研究

Babcock-Jackson 等(2002)研究了美国 Erie 湖食物网主要成分中的 MC 含量。蚌类、端足类和鱼体内的 MC 含量均远低于产生毒素的浮游植物(悬浮物)中的 MC 含量。依据该论文的数据计算了各类生物的生物放大因子(BMF)(表 9-4)。为此,设斑纹蚌的饵料为悬浮物,黑口新蝦虎鱼(*Neogobius melanostomus*)的饵料为斑纹蚌,端足类的饵料为斑纹蚌的粪便和伪粪便,蚌伪粪便中的 MC 含量约为蚌体中 MC 含量的 7.5 倍(Ibelings et al. 2005)。需要指出的是,在该研究中,黑口新蝦虎鱼肝脏中的 MC 含量为其饵料(斑纹蚌)的 9 倍,这与在荷兰 IJsselmeer 湖观察到的胡瓜鱼肝脏中的 MC 含量约为其饵料(浮游动物)3 倍的结果类似(Ibelings et al. 2005)。依据这些数据可以认为,MC 在 Erie 湖生态系统中不存在生物放大作用。

表 9-4 1998 年 8 月,美国 Erie 湖中不同食物网组分中的 MC-LReq 含量和生物放大因子(BMF)

Table 9-4 MC-LReq contents of different food web compartments and biomagnification factor (BMF) in August of 1998 in Lake Erie, US

种类 Species	ng/g WW	生物放大因子 BMF	
		悬浮物 Seston	饵料 Diet
悬浮物 Seston	45550* (9100~82000)		
底栖动物			
滤食性 Filter-feeding			
斑纹蚌 <i>Dreissena</i> spp.	~20	~0.04	~0.04
碎屑食性 Detritus-feeding			
端足类 <i>Echinogammarus ischnus</i>	200	0.4	1.3
底栖鱼类 Demersal fish			
黑口新蝦虎鱼肝脏 Liver of round goby <i>Neogobius melanostomus</i>	180* (60~300)	0.4	900

\* 中值 Medium values

(根据 Babcock-Jackson et al. 2002 的数据计算而得)

(Calculated from the data of Babcock-Jackson et al. 2002)

MC 的检测方法为 ELISA 法

MC was measured using ELISA

## 3. 我国巢湖的研究

通过对巢湖已发表和未发表资料的整理,计算出 MC 在各种类型动物体内(整体)的生物放大因子如表 9-5 所示,其中鲢的饵料为浮游植物,鲤的饵料为螺类。

这里未估算刀鲚和鳊对饵料生物的 BMF，因未测定浮游动物和水生高等植物体内的 MC 含量。鲫鱼为杂食性种类，红鳍原鲌、翘嘴鲌和黄颡鱼为肉食性种类，因无这些鱼类饵料生物中 MC 含量的数据，均未计算相应的 BMF。

表 9-5 2003 年我国巢湖不同食物网组分中的 MC 含量和生物放大因子(BMF)  
(MC 的检测方法为 HPLC)

Table 9-5 MC contents of different food web compartments and biomagnification factor (BMF) in 2003 in Lake Chaohu, China(MC was measured using HPLC)

种类 Species	MC( $\mu\text{g/g DW}$ )		*生物放大因子 BMF	
	肝脏/肝胰腺 Liver/Hepato	整体 Whole body	悬浮物 Seston	饵料 Diet
悬浮物 Seston	240 <sup>a</sup>			
底栖动物				
螺(Snail)				
铜锈环棱螺( <i>Bellamya aeruginosa</i> )	7.42 <sup>a</sup>	0.678 <sup>d</sup>	0.28	
虾(Shrimp)				
秀丽白虾( <i>Palaemon modestus</i> )	4.14 <sup>b</sup>	1.279 <sup>d</sup>	0.53	
日本沼虾( <i>Macrobrachium nipponensis</i> )	14.2 <sup>b</sup>	0.345 <sup>d</sup>	0.14	
鱼类 Fish				
浮游植物食性鱼类 Phytoplanktivorous fish				
鲢( <i>Hypophthalmichthys molitrix</i> , Hm)	1.16 <sup>c</sup>	0.073 <sup>e</sup>	0.03	0.03
浮游动物食性鱼类 Zooplanktivorous fish				
刀鲚( <i>Coilia ectenes</i> , Co)	—	0.324 <sup>e</sup>	0.14	
大型水生植物食性鱼类 Macrophyte-eating fish				
鳊( <i>Parabramis pekinensis</i> , Pp)	4.51 <sup>c</sup>	0.29 <sup>e</sup>	0.12	
杂食性鱼类 Omnivorous fish				
鲫( <i>Carassius auratus</i> , Ca)	1.76 <sup>c</sup>	1.61 <sup>e</sup>	0.67	
底栖动物食性鱼类 Benthivorous fish				
鲤( <i>Cyprinus carpio</i> , Cc)	8.45 <sup>c</sup>	0.297 <sup>e</sup>	0.12	43.8
凶猛性鱼类 Piscivorous fish				
红鳍原鲌( <i>Culter erythropterus</i> , Ce)	11.6 <sup>c</sup>	0.832 <sup>e</sup>	0.35	
翘嘴鲌( <i>Culter ilishaeformis</i> , Ci)	4.99 <sup>c</sup>	0.626 <sup>e</sup>	0.26	
黄颡鱼( <i>Pseudobagrus fulvidraco</i> , Pf)	7.89 <sup>c</sup>	0.653 <sup>e</sup>	0.27	

\* BMF 为“动物整体中的 MC 含量/悬浮物中的 MC 含量 $\times 100$ ”或“动物整体中的 MC 含量/饵料中的 MC 含量 $\times 100$ ” \* BMF is determined as “MC in whole animal / MC in seston $\times 100$ ” or “MC in whole animal / MC in diet $\times 100$ ”

a Chen et al. 2005; b Chen and Xie 2005a; c Xie et al. 2005; d 陈隽博士未发表数据，青虾为 8 月和 10 月的平均值 d Unpublished data of Dr. Jun Chen, and the figure for *Macrobrachium nipponensis* was the mean of August and October; e 谢丽强博士未发表数据 e Unpublished data of Dr. Liqiang Xie

在巢湖,生态系统中无其他组分中的 MC 含量超过产生毒素的浮游植物(悬浮物)中的 MC 含量。以动物整体中的 MC 含量来计算,各种动物对悬浮物中 MC 的 BMF 值均未超过 1,浮游生物食性鱼类(鲢)对其饵料生物(悬浮物)中 MC 的 BMF 值远小于底栖动物食性鱼类(鲤)对其饵料生物(螺)中 MC 的 BMF 值。与 Ibelings 等(2005)的结论相似,MC 在巢湖生态系统中也不存在生物放大作用。

## 六、MC 的理化参数与生物浓缩和放大

化学稳定性和高脂溶性是生物浓缩(bioconcentration)和放大的重要条件。例如,有机氯农药 DDT 具有很高的理化和生物稳定性,能在环境和生物体内长时间保持稳定(如混入土壤的 DDT 的半衰期为 5~8 年),DDT 的脂溶性很强,在水中的溶解度仅 0.02 mg/kg,而在脂类化合物中的溶解度可达  $1.0 \times 10^5$  mg/kg,是水中溶解度的 50 万倍,这类污染物与生物接触时,能迅速地被吸收,大量累积在脂肪组织中,很难被分解,也不容易排出体外(王连生 2004)。与 DDT 等持久型有机污染物相比,MC 的化学稳定性显著降低而亲水性显著增加,在水环境中容易降解,半衰期大约为 1 周(Codd and Bell 1996a, 1996b),MC-LR(10  $\mu$ g/L)在水库水中的半衰期约为 4 天(Cousins et al. 1996),MC-LR 在水中的溶解度大于 1 g/kg(Rivasseau et al. 1998)。

迄今为止,已有许多研究利用化合物的理化参数(如水溶解度、 $P_{ow}$ 、土壤吸附系数)对生物浓缩因子(BCF)进行估算,由于有机化合物在水和生物体内的分配过程和辛醇/水分配相似,基于辛醇-水分配系数  $P_{ow}$  的估算方法最多。 $P_{ow}$  是化合物疏水性的重要参数, $P_{ow}$  越小,亲水性越强,相反, $P_{ow}$  越大,疏水性越强。 $P_{ow}$  的大小影响着化合物的环境化学行为及生物的吸收、分布、代谢、排泄和毒性等。例如,一般来说,化合物的  $P_{ow}$  越小,在生物体内的累积能力越低。

大量的研究表明,各种水生生物(藻类、浮游动物、蚌类、鱼类等)的 BCF 与  $P_{ow}$  存在正相关关系。例如, Veith 等(1980)利用一系列的鱼种和 84 种不同的化合物得到如下的方程式:

$$\log BCF = 0.76 \log P_{ow} - 0.23 \quad (9-1)$$

Geyer 等(1987)报道, DDT、666、六氯联苯等化合物在人类脂肪组织(human adipose tissue)中的  $\log BCF_L$  和  $\log P_{ow}$  的关系如图 9-2 所示,可用下述直线方程式或双曲线方程式来描述(其中  $BCF_L$  表示基于生物体或组织的脂肪含量):

$$\log BCF_L = 0.745 \log P_{ow} - 1.19 \quad (9-2)$$

$$\log BCF_L = 2.54 \log P_{ow} - 0.22 (\log P_{ow})^2 - 4.56 \quad (9-3)$$

像 TCDD、PCB、HCB、DDT 这样的非电离(non-ionized)有机化合物难以被代谢以及具有高  $\log P_{ow}$  值(>4.5)，因此在人类脂肪组织中大量积累(Geyer et al. 1987)。

化合物的生物累积程度也取决于溶解度，如果化合物的溶解度  $S_w$  在 mg/L 范围内，则可用下列方程来估算  $BCF$ (Kenaga and Goring 1980):

$$\lg BCF = 2.791 - 0.564 \lg S_w$$

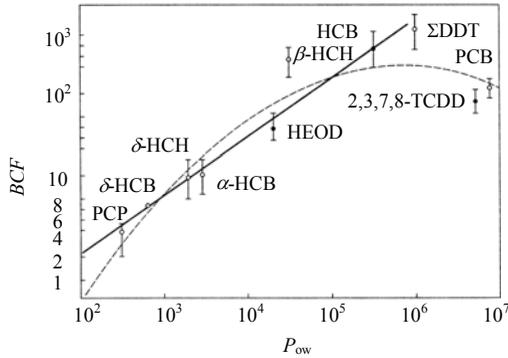


图 9-2 人类脂肪组织中的环境有机化合物的  $\log BCF_L$  ( $BCF_L$  以脂肪含量为基础) 与  $\log P_{ow}$  的关系(引自 Geyer et al. 1987)

每个点表示  $BCF_L$  的平均值和范围。实线=式(9-2)，虚线=式(9-3)

Fig. 9-2 Relationship between  $\log BCF_L$  ( $BCF_L$  on a lipid weight basis) of organic environmental chemicals in human adipose tissue and  $\log P_{ow}$  (Cited from Geyer et al. 1987)

Each point represents the mean and range of  $BCF_L$ . Solid line = equation (9-2), dashed line = equation (9-3)

由于 MC 的亲水性很强，例如，MC-LR 的  $\log P_{ow}$  仅为 -1.76~2.18 (pH 为 1~10) (De Maagd et al. 1999)，很难以溶解在水中的形式进入水生动物体内，这可以解释为何 Prepas 等(1997)将蚌置于高含量的溶解性 MC-LR 溶液中也未能在蚌体内检测出毒素，以及为何 MC 在水生态系统中无生物放大作用。根据 MC-LR 的高水溶解度(大于 1 g/L) (Rivasseau et al. 1998)，也可说明为何 MC-LR 的 BCF 很小。

由于水体中的蓝藻可不断地产生 MC，可以设想，如果 MC 的理化性质允许其在水生动植物体内进行生物浓缩和放大的话，水生态系统中的 MC 会累积到何等程度，而这样的后果可能是包括产毒蓝藻自身在内的所有水生生物面临灭顶之灾！自然界的进化历程避免了这种灾难的发生，这种毒性极强的多肽化合物仅被动物体有限地吸收。

## 第十章 MC 对人类健康的危害

蓝藻毒素对人类健康危害的证据主要来自三个方面：流行病学(epidemiological)调查、动物中毒以及毒理学研究。流行病学证据特别重要，因其能直接证明毒素暴露和人类健康的关系，但是这类研究往往是回顾性(retrospective)研究，特别是关于暴露(生物数量、毒素的类型和浓度)的完整的流行病学数据十分稀少。蓝藻导致动物中毒的事件报道很多，但鲜有对毒素进行定量的，因此无法外推到人类。动物毒性试验虽然不能在完全自然暴露的条件下进行，但能针对不同的种类以及控制实验室条件，因而对阐明毒素在人类及动物中毒中的作用以及比较相对毒性均十分重要，其中口服毒性试验特别有用，已在较大的动物以及啮齿类(rodent)中进行了试验(Kuiper-Goodman et al. 1999)。在已知的蓝藻毒素中，环状多肽(MC 和节球藻毒素)被认为对人类健康的威胁最大。

### 一、与蓝藻水华和毒素有关的人类健康事件

历史上最早的关于蓝藻对人类的毒害作用可追溯到 1000 多年前的中国，当时诸葛亮记载了他的部队从中国南部的一条发绿(推测可能是蓝藻)的河流中取水饮用而中毒死亡(Chorus and Bartram 1999)。关于蓝藻引起人类肠胃炎的最早的报道见于 1931 年，发生在沿俄亥俄河的一系列城镇，当时，由于降水量少，Ohio 河的一个支流发生了蓝藻水华，水华随后流入干流，随着其向下游的移动引发了一系列的疾病，而这些都不能归结为传染源(infectious agent)(Tisdale 1931, Carmichael and Falconer 1993)。在津巴布韦的哈拉雷市，生活在一个特定的水库供水的某一区域的儿童，每年都发生肠胃炎，但找不到感染源，但其时间刚好与该水库的微囊藻水华的分解同步，而在该城市使用其他供水的儿童则未出现肠胃炎(Zilberg 1966)。

将人类疾病与蓝藻及毒素相联系的证据常常受到质疑，因为早期缺乏对病例的详细定义，诊断(diagnose)也是采用排他法，直到最近才对中毒事件中的毒素进行确认和定量(Codd 2000)。但是，无论如何这些证据都是十分重要的，因为它直接证实了毒素暴露和人类健康的联系，而这是无法从动物实验中得到的(Kuiper-Goodman et al. 1999)。从大量的人类中毒事件以及动物实验研究，人们认识到接触或摄取蓝藻细胞和毒素，可引起一系列有害健康的后果，如皮肤刺激(skin irritation)、过敏反应(allergic response)、黏膜起泡(mucosa blistering)、肌肉和关节痛(muscular and joint pain)、肠胃炎(gastroenteritis)、肺脏实变(pulmonary consolidation)、肝肾损伤(liver and kidney damage)和各种各样的神经性(neurological)影响(Codd 2000)。

流行病学研究表明,我国肝癌高发区主要分布在东南沿海地区(如江苏启东市和海门市、福建同安市、广东顺德市、广西省扶绥市),原发性肝癌发病率与沟塘水的利用有密切关系,通过对沟塘饮用水中的蓝藻毒素的测定,发现沟塘和河流饮用水中的 MC 是东南沿海地区肝癌高发的危险因素之一(Ueno et al. 1996, Yu 1989, 1995, 周学富等 1999, 穆丽娜等 2001, 俞顺章等 2001, 孙昌盛等 2002)。

表 10-1 列出了历史上在淡水水体中发生的与蓝藻水华和毒素有关的人类健康事件。在澳大利亚新南威尔士的 Malpas 水库,流行病学研究检测到饮用水源的有毒蓝藻污染与肝损伤的同步性。在迄今为止的已确定了毒素类型的流行病学证据中,以 1996 年巴西 Caruaru 透析中心的致命 MC 中毒事件最为著名。

## 二、澳大利亚 Malpas 水库饮用水源有毒蓝藻污染 对人类健康的影响

20 世纪 80 年代初,人们监测到澳大利亚新南威尔士(New South Wales)发生的饮用水源被蓝藻污染产生了对人类健康的有害影响(Kuiper-Goodman et al. 1999)。位于新南威尔士的 Malpas 水库是 Armidale 市的饮用水源,自 20 世纪 70 年代初起,该水库由于富营养化经常发生铜绿微囊藻水华。该水库位于一个高地上,比自来水厂高出 150 m,自来水厂通过近 20 km 长的管道与水库连接。水处理的方法有预加氯消毒法(pre-chlorination)、明矾絮凝(alum flocculation)、沉淀(sedimentation)、快速沙过滤(rapid sand filtration)、后加氯消毒(post-chlorination)与氟化(flocculation)。该蓄水池的地理特征使得排水管区域(offtake area)在风力作用下堆积有毒水华。当地水处理部门用硫酸铜来控制水华,即在水源的上端空中喷洒 1 mg/kg 的铜。蓝藻水华的毒素被确定为 MC-YM (Botes et al. 1985)。

在 1981 年,人们监测了一次大范围有毒微囊藻水华的发展及其后由于使用硫酸铜而终结的过程。在水华发生时,由于人们抱怨饮用水味道不好及有异味(odour),用硫酸铜处理了水库。这一事件是其后对饮用该水源的人群进行肝功能流行病学回顾性研究的基础。同时,与同一地区从其他水库取得饮用水的人群进行了比较。血浆(plasma)中反映肝功能酶活性的数据来自区域病理实验室(regional pathology laboratory)患者的血液样品,包括水华发生前 6 个星期、水华高峰到结束的 6 个星期及其后 6 个星期的样品。然后将数据分为利用 Malpas 水库饮水的患者及利用其他水源的患者。从图 10-1 可以看出,饮用 Malpas 水库人群血液中的  $\gamma$ -谷氨酰转氨酶(gamma glutamyl transferase)活性在水华高峰期——用硫酸铜处理期间显著高于在此之前或之后,也显著高于用不同水源的其他人群。而临床记录显示并无传染性肝炎(infectious hepatitis)的暴发或异常酒精中毒(disproportionate alcoholism)发生(Falconer et al. 1983)。平均酶活力的增加表示轻度的肝毒性,而所研究人群的酶活性有很大的增加,表明存在相当的肝损伤。

表 10-1 淡水水体中与蓝藻水华和毒素有关的人类健康事件

Table 10-1 Exposure routes and human health incidents associated with or attributed to cyanobacterial blooms and toxins in freshwaters

暴露途径 Exposure route	年 Year	地点 Location	病例 Case	水源中的蓝藻 Cyanobacteria in source water	蓝藻毒素 Cyanotoxins	健康后果 Health outcomes <sup>a</sup>	文献 Reference
饮水 Drinking water	1931	美国俄亥俄河 Ohio River, USA	人群 Population	蓝藻水华 Cyanobacterial bloom	未知 Unknown	GI	Tisdale 1931
	1960	津巴布韦的一水库 A reservoir, Zimbabwe	儿童 Children	微囊藻 <i>Microcystis</i>	未知 Unknown	GI	Zilberg 1966
	1975	美国 Sewickley 水库 Sewickley Reservoir, USA	ca. 5000	裂须藻 <i>Schizothrix</i> , 织线藻 <i>Plectonema</i> , 席藻 <i>Phormidium</i> , 鞘丝藻 <i>Lyngbya</i>	未知 Unknown	GI	Lippy and Erb 1976, Sykora and Keleti 1981
	1979	澳大利亚 Solomon 水库 Solomon Dam, Australia	149	拟柱胞藻 <i>Cylindrospermopsis</i>	拟柱胞藻毒素 psin	GI, KD, LD, ID	Byth 1980, Griffiths et al. 1998
	1981	澳大利亚 Malpas 水库 Malpas Dam, Australia	来自 25 000 人群的样本 Sample from exposed population of 25 000	微囊藻 <i>Microcystis</i>	MC	LD	Falconer et al. 1983
	1972- 1990+	中国东南部县镇 Counties and townships, SE China	暴露人群每 10 万人的死亡 数 Deaths per 100 000 of exposed population	微囊藻 <i>Microcystis</i>	MC	PLC	Yu 1989, 1995
	1988	巴西 Itaparica 水库 Itaparica Dam, Brazil	2000 个患者中死亡 88 人 2000 Incl. 88 deaths	鱼腥藻 <i>Anabaena</i> , 微囊藻 <i>Microcystis</i>	未知 Unknown	GI	Teixeira et al. 1993
娱乐/接触水 Recreation/water contact	1989		8	微囊藻 <i>Microcystis</i>	MC	GI, ST, BM, AP, F, V	Turner et al. 1990

暴露途径 Exposure route	年 Year	地点 Location	病例 Case	水源中的蓝藻 Cyanobacteria in source water	蓝藻毒素 Cyanotoxins	健康后果 Health outcomes <sup>a</sup>	文献 Reference
			2	微囊藻 <i>Microcystis</i>	MC	GI, ST, BM, AP, F, V, PC	
	1995	澳大利亚南部维多利亚 岩干地区 Sites in Victoria, South Australia	777	微囊藻 <i>Microcystis</i> , 鱼腥藻 <i>Anabaena</i> , 束丝藻 <i>Aphanizomenon</i> , 节球藻 <i>Nodularia</i>	出现肝毒素 Hepatotoxin present	GI, FLS, BM, F, EE	Pilotto et al. 1997
	1996	英国 Hollingworth 湖 Hollingworth Lake, UK	11	颤藻 <i>Oscillatoria</i>	MC	R, F	Codd and Beattie (未发表 unpublished)
血透析 Haemodialysis	1974	美国华盛顿(透析诊所) Washington DC, USA (dialysis clinic)	23	出现 Present	LPS	F, MY, C, V	Hindman et al. 1975
	1996	巴西 Tabocas 水库和 Caruaru 透析中心 Tabocas Reservoir, and dialysis center, Caruaru, Brazil	117 名患者中超过 50 人死亡 117 Including over 50 deaths	出现 Present	MC	VID, N, V, LD	Barreto et al. 1996, Jochimsen et al. 1998, Pouria et al. 1998

a GI: 肠胃炎 gastroenteritis; LD: 肝损伤 liver damage; KD: 肾损伤 kidney damage; ID: 肠损伤 intestinal damage; PLC: 原发性肝癌 primary liver cancer; ST: 喉痛 sore throat; BM: 口腔起泡 blistered mouth; F: 发烧 fevers; EE: 眼睛和耳朵刺激 eye and ear irritation; FLS: 类似于流感的症状 flu-like symptoms; R: 皮疹 rashes; MY: 肌痛 myalgia; C: 发寒 chills; V: 呕吐 vomiting; VID: 视力模糊 visual disturbances; N: 恶心 nausea; AP: 腹痛 abdominal pains; PC: 肺脏突变 pulmonary consolidation (修改自 Codd 2000) (adapted from Codd 2000)

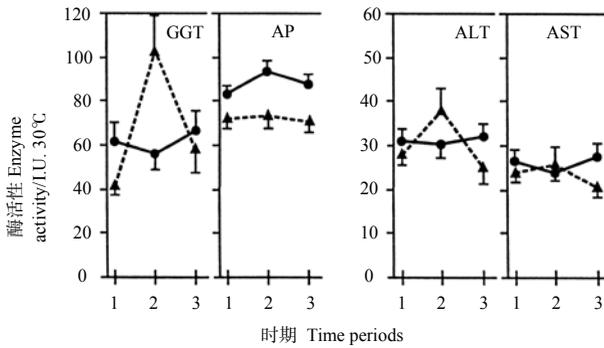


图 10-1 在 Malpas 水库暴发严重的蓝藻水华期间以及用硫酸铜处理期间，饮用该水库水患者血清中的肝功能酶活性与同一地区从其他水库取得饮用水的人群的比较(引自 Falconer et al. 1983)

GGT:  $\gamma$ -谷氨酰转移酶; ALT: 谷丙转氨酶; AST: 谷草转氨酶; AP: 碱性磷酸酶。时期:

1: 水华发生前; 2: 水华期间; 3: 水华结束后。供水: ▲: Malpas 水库; ●: 其他

Fig. 10-1 Serum enzymes measuring liver function in patients consuming drinking water from Malpas Dam or from other supplies during a heavy bloom of *Microcystis aeruginosa* and its termination with copper (Cited from Falconer et al. 1983)

GGT: gamma glutamyl transferase; ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase;

AP: alkaline phosphatase. Time periods: 1: Pre-bloom; 2: bloom; 3: post-bloom.

Water supply: ▲: Malpas dam; ●: other

### 三、巴西 Caruaru 透析中心的致命 MC 中毒事件

过去，虽然人们怀疑过蓝藻毒素能引起人类中毒，但是由于以下原因而无法确认：①缺乏能证明在食物或饮水中有蓝藻毒素存在的载体(vector)或环境(circumstance)的相关资料；②缺乏合适的检测手段。因为大部分蓝藻毒素中毒仅仅发生在大量蓝藻水华堆积的情况下，而人类不会发生急性中毒，因为人们一般会避免与这种高浓度蓝藻的接触，此外，饮用水通常会得到一定程度的处理，可避免高浓度蓝藻毒素的出现。这就是为何 MC 通过口腔的途径导致人类严重的急性中毒事件十分稀少。但是，口腔并非人们摄入 MC 的唯一途径(Carmichael et al. 2001)。

在人群中，由于各种原因，有些个体受 MC 的危害远较其他个体为高，其中对肾透析的患者来说，如果用于透析的水被 MC 污染，危险性特别大，因为透析处理使患者通过静脉(intravenously)接触到大量被污染的水(Kuiper-Goodman et al. 1999)。被世界各国广为报道的巴西血透析事件是人类唯一一起被确认的由 MC 污染引起的致命中毒事件(Carmichael et al. 2001, Azevedo et al. 2002)。

据报道(Carmichael et al. 2001, Azevedo et al. 2002)，在巴西的 Caruaru 透析中心，透析水取自 Tabocas 水库，该水库蓝藻占优势，例如，1996 年 3 月，蓝藻占浮游植物总量的 97%~99%，优势种为束丝藻 *Aphanizomenon manguinii* 和两种颤藻(*Oscillatoria*)。而 1990~1995 年间的资料显示，该水库的优势蓝藻为产 MC 的微

囊藻(*Microcystis*)和鱼腥藻(*Anabaena*), 以及产拟柱胞藻毒素(*cylindrospermopsin*)的拟柱胞藻(*Cylindrospermopsis*)。在该透析中心, 于1996年2月13~20日期间接受了常规透析治疗的131个患者中, 有116人(占89%)出现了视力模糊(*blurred vision*)、恶心(*nausea*)和呕吐(*vomiting*)等症状(2月13日开始, 患者开始抱怨出现这些症状)。2月20日出现第1个突然死亡的患者, 至4月中旬共死亡51个患者。至1996年10月, 在出现急性肝衰竭(*acute liver failure*)的100个患者中, 共有76个患者死亡。至1996年12月, 已确认的死亡者中, 有52人归因于透析水中的MC(MC-YR、MC-LR和MC-AR)污染。

对从39个死亡者(1996年2~12月)中获得的52份肝脏样品以及从12个死亡者获得的17份血清(*serum*)样品的MC含量, 通过ELISA和HPLC-PDA进行定量分析, 得到肝脏中MC含量的平均值为223(50.2~471.8) ng/g, 血清中平均含量为2.2 ng/mL(图10-2); 通过MALDI/TOF-MS, 确认了肝脏中的MC-LR(*m/z* 995)、MC-YR(*m/z* 1045)和MC-AR(*m/z* 954)的存在(Carmichael et al. 2001)。最近, Hilborn等(2005)又通过ELISA和LC-MS两种方法对当时10个Caruaru透析死亡者获得的10份血清样品进行了定量测定, 得到的平均值分别为19.1(6.8~30.6) ng/mL和21.2(7.6~31.4) ng/mL。

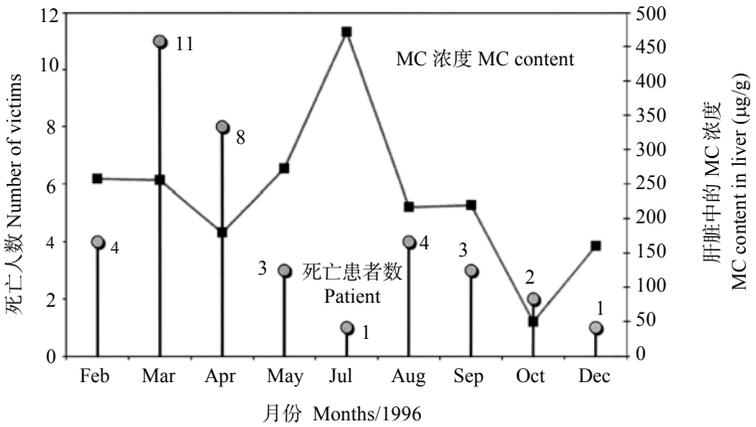


图10-2 每月死亡的Caruaru透析者肝脏样品中的平均MC浓度(引自Azevedo et al. 2002) 数据代表1996年2~12月期间从39个死者采集的52份肝脏样品。 染毒患者血清中的平均MC含量为2.2 ng/mL

Fig. 10-2 Average microcystin content (ng/g) in liver samples from Caruaru dialysis victims per month of death (Cited from Azevedo et al. 2002) Data represent 52 livers samples from 39 victims, covering February to December 1996. The average microcystin content in sera from affected patients was 2.2 ng/mL

Carmichael 等(2001)对 1996 年 2 月 13~17 日期间在 Caruaru 透析中心使用的透析水中 MC 含量进行了推算: 假设肝脏的平均重量为 1500 g, 每人每次透析用水为 120 L, 使用两个校正因子: ① 肝脏中的 MC 量占总 MC 负荷的 50%; ② 与 PP-1 和 PP-2A 共价结合(因而可能不会被 ELISA 法检测出)的量占总量的 80%, 则透析水中的 MC 含量可能高达 19.5  $\mu\text{g/L}$ 。

很显然, 上述透析患者之所以出现 MC 急性中毒致死, 主要是: ①透析水中的 MC 通过透析患者的静脉直接进入血液, 而一般饮用水需通过消化道; ②一个成年人每天的饮水量一般仅 2 L 左右, 而透析用水则高达 120 L; ③器官受伤的人(如透析患者)可能受 MC 的危害更重。用小白鼠进行的毒理学实验结果表明, 口服微囊藻萃取物或纯 MC-LR 的  $\text{LD}_{50}$  为腹腔注射的 50~170 倍(Falconer 1991, Kotak et al. 1993b, Yoshida et al. 1997), MC-YR 和 MC-LR 的毒性类似(Kuiper-Goodman et al. 1999)。由于透析水中的 MC 含量可能高达 19.5  $\mu\text{g/L}$ (Carmichael et al. 2001), 而 WHO 建议 MC-LR 在饮用水中的标准为 1  $\mu\text{g/L}$ (WHO 1998), 因此, 推测出上述透析患者摄入的 MC 量为 WHO 建议的 TDI 标准的 58 500~198 900 倍!

Carmichael 等(2001)推测可能存在多次 MC 接触, 但同时又认为可能主要来自 3 月 7 日前使用的某一两次从水库用货车运过来的水。然而, 从图 10-2 可以看出, 在 2~10 月期间, 死亡患者肝脏中的 MC 含量都维持在较高水平(除 10 月份外, 其余月份均在 150 ng/g 之上)。由于小白鼠肝脏中 MC 的半衰期只有数天(Robison et al. 1990), 因此推测应存在反复的 MC 接触。

## 四、人类是否比水生动物对 MC 更加脆弱?

巴西 Caruaru 透析中心的人类急性 MC 中毒事件是获得人类致死 MC 剂量的最直接方式。将死亡患者肝脏和血液中的 MC 含量与水生动物的相关器官中的 MC 含量进行比较, 可以作为判断人类与水生动物对 MC 抗性强弱的重要指标之一。

为了便于比较, 我们将 Caruaru 透析中心死亡患者肝脏和血液中的 MC 含量换算成每克干组织的毒素含量。人类肝脏的含水量约为 70%, Carmichael 等(2001)和 Azevedo 等(2002)所测得的死亡患者肝脏中的平均 MC 含量为 0.743 (0.167~1.573)  $\mu\text{g/g DW}$ ; 人类血浆的含水量约为 10%, Azevedo 等(2002)所测得的死亡患者血清中 MC 的平均含量为 0.022  $\mu\text{g/g DW}$ 。Hilborn 等(2005)通过 ELISA 和 LC-MS 所测得的血清中 MC 的平均含量分别为 0.19  $\mu\text{g/g DW}$  和 0.21  $\mu\text{g/g DW}$ 。

### 1. 鱼类与 Caruaru 透析中心死亡患者肝脏和血液中 MC 含量的比较

从野外或亚慢性毒性实验中采集到的活鱼肝脏和血液中的 MC 含量(第三章, 第四章表 4-4)远远高于从 Caruaru 透析中心死亡患者肝脏和血液中检测出的 MC 含量。例如:

(1) 荷兰 IJsselmeer 湖中胡瓜鱼肝脏中的 MC 含量高达 874  $\mu\text{g/g}$  AFDW(比巴西 Caruaru 透析中心 MC 中毒死亡患者肝脏中 MC 含量的最大值高出约 300 倍), 欧洲鲈肝脏中的 MC 含量也达 194  $\mu\text{g/g}$  AFDW(Ibelings et al. 2005)。

(2) 巴西一浅海岸潟湖中红胸罗非鱼肝脏中的最高浓度达 31.1  $\mu\text{g/g}$  WW (Magalhaes et al. 2001); 2003 年 9 月, 巢湖 7 种鱼类肝脏和血液中 MC 的平均含量分别达 5.77(1.16~11.6)  $\mu\text{g/g}$  DW 和 14.5(3.31~46.43)  $\mu\text{g/g}$  DW(Xie et al. 2005)。

(3) 在 80 天的室内毒性实验中(反复投喂新鲜有毒微囊藻), 鲢肝脏和血液中的 MC 平均含量在 A 桶中分别为 11.97(8.79~17.76)  $\mu\text{g/g}$  DW 和 24.68(0.34~49.68)  $\mu\text{g/g}$  DW, 在 B 桶中分别为 10.57(1.69~24.63)  $\mu\text{g/g}$  DW 和 10.07(0~37.02)  $\mu\text{g/g}$  DW (Xie et al. 2004)。

在太湖梅梁湾的大型围隔实验中, 鳙主要以有毒蓝藻为食, 其肝脏和血液中 MC 含量的年平均值为 0.374(0.00~2.83)  $\mu\text{g/g}$  DW 和 0.052(0.00~0.238)  $\mu\text{g/g}$  DW, 而鳙从 4 月的均重 264 g 增长到 10 月份的 2811 g (体重增加了 10.6 倍)(Chen et al. 2006)。在这一研究中, 鳙鱼肝脏和血液中的 MC 含量与巴西 Caruaru 透析中心的 MC 中毒死亡患者肝脏和血液中的 MC 含量十分接近。但是, 鳙的生存不仅没受到影响, 生长反而十分迅速。

## 2. 无脊椎动物肝胰腺与 Caruaru 透析中心死亡患者肝脏中 MC 含量的比较

而从一些野外或室内毒性实验中检测出的活无脊椎动物肝胰腺中的 MC 含量(表 5-3 和表 6-6)更是远远高于从 Caruaru 透析中心死亡患者肝脏中检测出的 MC 含量, 例如:

(1) 日本 Suwa 湖中圆顶珠蚌和褶纹冠蚌肝胰腺中 MC 含量的最大值分别达 420  $\mu\text{g/g}$  DW 和 297  $\mu\text{g/g}$  DW(Yokoyama and Park 2002)。

(2) 在圆顶珠蚌 *Unio douglasiae* 对微囊藻 *Microcystis ichthyoblabe* 中 MC-LR 的摄取实验中, 大约经过 5 天, 肝胰腺中 MC 达到稳定状态: (130 $\pm$ 11)  $\mu\text{g/g}$  DW (15 $^{\circ}\text{C}$ ) 和(250 $\pm$ 40)  $\mu\text{g/g}$  DW(25 $^{\circ}\text{C}$ ), 最大值高达 630  $\mu\text{g/g}$  DW(Yokoyama and Park 2003)。

(3) 在石田螺 *Sinotia histrica* 对微囊藻中 MC-LR 的摄取实验中, 肝胰腺中 MC 含量在第 10 天达 436  $\mu\text{g/g}$  DW(Ozawa et al. 2003)。

(4) 在淡水无齿蚌 *Anodonta cygnea* 对阿氏颤藻(*Oscillatoria agardhii*)中 MC 的累积实验中, 经过 15 天, 蚌体内 MC 的平均含量高达 70  $\mu\text{g/g}$  DW (Eriksson et al. 1989a)。

这些列举的活软体动物肝胰腺中的 MC 含量的最大值, 比巴西 Caruaru 透析中心的 MC 中毒死亡患者肝脏中 MC 含量的最大值(2.83  $\mu\text{g/g}$  DW)高出 25~223 倍!

通过对肝脏(肝胰腺)和血液中 MC 含量的比较可见, 在自然或实验条件下, 活体鱼类和水生无脊椎动物体内累积的 MC 含量远远高于人类的致死 MC 浓度。这足以说明人类比水生动物对 MC 要脆弱得多!



图 10-3 经过毒素萃取物处理过的瑞士 Albino 雄鼠(品系 IOPS OF1)肝脏被固定后肉眼可见的病理学变化 (引自 Briand et al. 2003)

左上图小白鼠肝脏仅注射 0.9% NaCl, 右上图是未灌注的小白鼠(对照)的肝脏, 下图是注射了从野外采集的产 MC 的 *Planktothrix agardhii* 萃取物(20 mg 冻干样品/mL, 用 0.9% 的 NaCl 作为萃取剂, 注射剂量 1000 mg DW/kg BW)的小白鼠肝脏

Fig. 10-3 Macroscopic pathology of fixed livers from Male Swiss Albino mice (IOPS OF1 strain) treated with toxic extracts (Cited from Briand et al. 2003)

Top left: a mouse liver injected with 0.9% NaCl, top right: a non-perfused mouse liver as control. Bottom: liver of mouse injected with an extract(20 mg lyophilized sample/mL, 0.9% NaCl used as extraction solvent, i.e., 1000 mg/kg) of a field sample of *Planktothrix agardhii*(producing microcystins)

### 3. 哺乳动物(小白鼠)和鱼类腹腔注射 MC-LR 的 LD<sub>50</sub> 的比较

MC-LR 对哺乳动物毒性极强: 对小白鼠腹腔注射的 LD<sub>50</sub>(单次注射或投喂导致在 7~14 天的期间内 50% 动物死亡的剂量)为 25~150 μg/kg BW(一般认为 50~60 μg/kg BW), 其他几个常见毒素(MC-LA、MC-YR 和 MC-YM)与 MC-LR 的 LD<sub>50</sub> 相近, 而 MC-RR 的 LD<sub>50</sub> 较低, 约有 MC-LR 的 1/10(Kuiper-Goodman et al. 1999)。而小白鼠在填喂微囊藻粗毒素的 LD<sub>50</sub> 大约为腹腔注射同样粗毒素 LD<sub>50</sub> 的 50~170 倍(Falconer 1991, Kotak et al. 1993a), 这可能表明进入肠道的 MC 大部分被降解或被排泄掉。

而鱼类腹腔注射 MC-LR 的 LD<sub>50</sub> 远高于小白鼠: 鲤鱼(*Cyprinus carpio*)腹腔注射 MC-LR 的 LD<sub>50</sub>(7 天的实验)在 300~550 μg/kg BW(Råbergh et al. 1991); 虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)腹腔注射 MC-LR 的 LD<sub>50</sub>(24~26 h 的实验)为 400~550 μg/kg BW(Tencalla et al. 1994, Kotak et al. 1996a); 鲫鱼(*Carassius auratus*)腹腔注射 MC-LR 的 LD<sub>50</sub> 为 380 μg/kg BW(Baldia et al. 2002); 鲈(*Pera fluviatilis*)腹腔注射 MC-LR 的 LD<sub>50</sub> 高达 1500 μg/kg BW(Ibelings et al. 2005); 大西洋鲑鱼(*Salmo salar*)腹腔注射 550 μgMC-LR/kg BW 3 次(隔 3 天一次), 在 36 天的实验期间很少死亡

(Andersen et al. 1993)。

因此，从对上述 LD<sub>50</sub> 的比较可知，鱼类对 MC-LR 的耐性远强于小白鼠。

## 五、MC 致哺乳动物和鱼类死亡的组织病理学特征

大量的组织病理学研究表明，MC 损害肝脏(图 10-3)，急性 MC-LR 中毒使哺乳动物(小白鼠和大白鼠)肝细胞结构破坏(如微丝塌陷、肝细胞收缩、毛细血管破裂)(图 10-4)，身体中的血液在肝脏中大量汇集，导致肝脏大出血(massive hemorrhage)而死亡(Falconer et al. 1981, Dabholkar and Carmichael 1987, Adams et al. 1988, Eriksson et al. 1989b, Hermansky et al. 1990, Kotak et al. 1993a, b, Carmichael 1992, Carmichael 1994, Kotak et al. 1996a)。

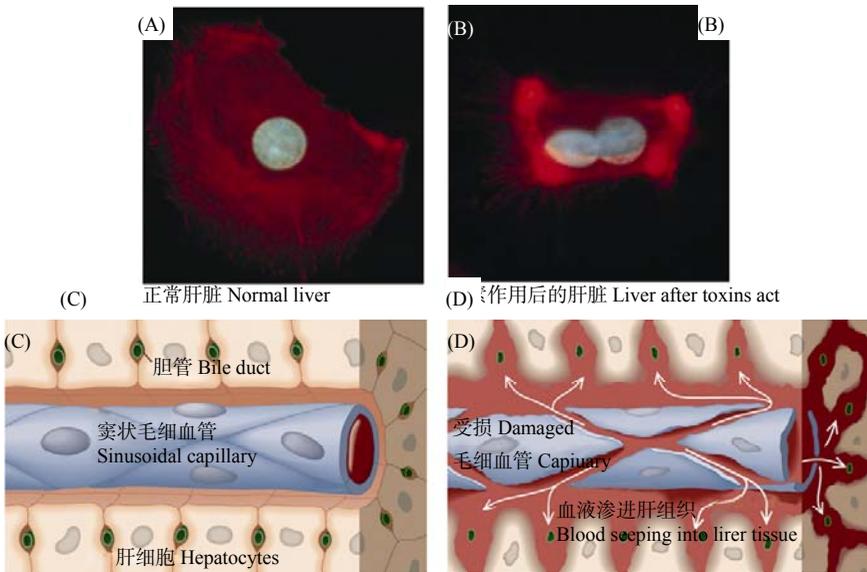


图 10-4 细胞结构成分的微丝(显微图片中的红色细丝)，如图(A)大白鼠的肝细胞所示，通常很长。但是，暴露于 MC 后，微丝向细胞核塌陷(蓝色)(该细胞像许多正常的肝细胞一样出现两个细胞核)(B)。这种塌陷使原来互相正常接触以及与窦状毛细血管相连的肝细胞收缩(C)。然后，这些收缩的细胞互相分离以及从毛细血管分离(D)。毛细血管的细胞也随之分离，导致血液溢进肝组织。

这种出血能很快导致死亡(引自 Carmichael 1994)

Fig. 10-4 Microfilaments (red threads in micrographs), structural components of cells, are usually quite long, as in the rat hepatocyte (A). But after exposure to microcystins (B), microfilaments collapse toward the nucleus (blue). (This cell, like many healthy hepatocytes, happens to have two nuclei.) Such collapse helps to shrink hepatocytes-which normally touch one another and touch sinusoidal capillaries (C). Then the shrunken cells separate from one another and from the sinusoids (D). The cells of the sinusoids separate as well, causing blood to spill into liver tissue. This bleeding can lead swiftly to death (Cited from Carmichael 1994)

鱼类的组织病理学研究表明，急性 MC-LR 中毒致鱼类死亡的机制与哺乳动物明显不同。腹腔注射有毒 *Microcystis aeruginosa* 的虹鳟肝脏以及腹腔注射 MC-LR 的鲤鱼肝脏中未出现明显的充血(congestion of blood)(Phillips et al. 1985, Råbergh et al. 1991)。Kotak 等(1996a)报道，腹腔注射 MC-LR 的虹鳟虽然也出现肝肿大，但出血不是虹鳟的显著特征；虹鳟肝肿大可能主要起因于肝细胞肿胀(hepatocellular swelling)，如水变性(hydropic degeneration)，因为在解剖虹鳟时，观察到虹鳟肝脏有淡黄色(straw-colored)液体渗出，因此认为 MC 致虹鳟死亡的最终原因可能是由于大量肝细胞坏死(massive hepatocyte necrosis)而导致的肝功能衰竭(hepatic failure)，而非在小白鼠中常见到的低血容量性休克(hypovolemic shock)。由于鱼类不像哺乳动物那样出现肝充血，因此 MC 致鱼类死亡的原因可能主要是肝功能失调(malfunction of liver)，而不是循环系统障碍(circulatory disturbance) (Bury et al. 1997)。

关于哺乳动物的体外和体内(*in vitro* and *in vivo*)模型研究表明，MC 对肝脏的严重影响不是通过改变细胞膜的选择通透性(selective membrane permeability)，而是通过对细胞骨架的影响(cytoskeletal effect)(Eriksson et al. 1987, Falconer and Runnegar 1987, Eriksson et al. 1989a)，尤其对小白鼠肝细胞微丝的影响特别明显(Eriksson et al. 1989a)。不久，人们发现 MC 强烈地抑制两种蛋白磷酸酶(protein phosphatase)(PP-1 和 PP-2A)的活性(Eriksson et al. 1990b, MacKintosh et al. 1990, Matsushima et al. 1990)，而蛋白磷酸酶活性的抑制导致(细胞骨架蛋白)磷酸化(phosphorylation)增加(Eriksson et al. 1990b)。

值得注意的是，在腹腔注射 MC-LR 的鲤鱼肝脏中，通过电镜也观察到在鲤鱼肝细胞中有显著的微丝重组(reorganization of microfilament)(Råbergh et al. 1991)。这表明，MC 对鱼类肝细胞的致毒机制可能与哺乳动物类似，但致死机制却不同。

## 六、为何陆生哺乳动物比水生动物对 MC 更加脆弱？

Williams 等(1995)推测可能是由于以下三种机制使鱼类比陆生动物对 MC 的抗性要强得多：① 大西洋鲑鱼对 MC-LR 的清除速率比小白鼠要快得多；② 由于 MC-LR 引起动物死亡的重要原因之一是能导致血管损伤(Hooser et al. 1989)，而鱼类的血压(blood pressure)比哺乳动物低(Ellis et al. 1978)；③ 一般来说，鱼类可能比陆生动物更多地暴露于存在 MC 的环境中，因而也许在进化的过程中，获得了比陆生动物强的抗性。关于不同动物类群适应性差异的可能影响目前仅停留在推测阶段(Xie et al. 2004)，是否存在适应性及其作用和调控机制如何等问题还远远没有被认识。

Kotak 等(1996a)列举了两个鱼类比陆生动物对 MC 的抗性要强的可能原因。

其一是由于血液在鱼类肝脏中的灌注速率(perfusion rate)较低(不到哺乳动物的1/4, Gingerich 1982), 这样与小白鼠相比, 可能减少 MC 到达肝脏的初始含量; 其二是由于鱼类肝脏对 MC 的摄取较慢, 虽然这还只是推测。有研究表明, 随着环境温度的降低, 大白鼠离体肝细胞对 MC-YM 的吸收显著降低(Runnegar et al. 1991), 而大多数鱼类生存的环境温度比哺乳动物的体核温度(core body temperature)(37℃)要低许多, 因此鱼类对 MC 的吸收速率应较哺乳动物低(Kotak et al. 1996a)。

## 七、小白鼠和鱼类肝脏对放射性同位素标记的 MC 吸收和清除速率比较

鱼类肝脏对放射性同位素标记的 MC-LR 的吸收速率和结合(incorporation)百分率远比小白鼠低: 将 $[^3\text{H}]$ -MC-LR 注射到饥饿小白鼠(fasted mice)的腹腔(剂量 13~101  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )后, 经过 6 h, 50%~60%分布于肝脏(Robison et al. 1989), 将亚致死(sublethal)剂量的 $[^3\text{H}]$ -MC-LR 注射到小白鼠的腹腔后, 经过 1 h, (67 $\pm$ 4)%分布于肝脏(Robison et al. 1991b), 将 $[^{14}\text{C}]$ -MC 注射到小白鼠腹腔(剂量 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), 仅 1min 时间就有 70%的毒素累积到肝脏(Brooks and Codd 1987); 而将 $[^3\text{H}]$ -MC-LR 注射到大西洋鲑鱼的腹腔(剂量 1 mg/kg)后, 经过 2 h 和 5 h, 仅有 2.8%~4.9%分布于肝脏(Williams et al. 1995); 将 $[^{14}\text{C}]$ -MC-LR 注射到大西洋鲑鱼的腹腔(剂量 1mg/kg)后, 经过 2 h 和 5 h, 有 11.9%~16.6%分布于肝脏(Williams et al. 1997a)。用 MC-LR 注射到大西洋鲑鱼的腹腔(剂量 2 mg/kg)后, 用 Lemieux 氧化法-GC/MS 测定技术检测到经过 7 h 有 31.4%~34.3%分布于肝脏(Williams et al. 1997b)

大西洋鲑鱼对毒素的清除比小白鼠快: 在小白鼠, 腹腔注射 $[^3\text{H}]$ -MC-LR 8 天后, 肝脏和其他残体(carcaass)中仍然保留有 50%和 8%的放射性标记(Robison et al. 1990); 而大西洋鲑鱼腹腔注射 $[^3\text{H}]$ -MC-LR 46 h 后, 整个身体对放射性标记的保留率已不超过 13%; 腹腔注射 $[^{14}\text{C}]$ -MC-LR 43.5 h 后, 整个身体对放射性标记的保留率为 37.9%(Williams et al. 1997a)。

## 八、不同动物类群循环系统的进化与血压

可以设想, 如果一种毒物能导致肝脏中的血管损伤, 那么其毒性效应将与血压呈正相关, 即血压越高, 血管越容易破裂。

哺乳动物的血液循环方式与鱼类和无脊椎动物的血液循环有巨大的差别。在动物的进化过程中, 循环系统经历了从无到有、从开放到封闭以及驱动血液循环的中空、能搏动的特殊的肌肉器官——心脏(heart)形成的过程。

一些低等的无脊椎动物, 如单细胞的原生动物、海绵动物和肠腔动物均没有循

环系统，多细胞动物发展到较高级阶段后才出现循环系统，绝大多数节肢动物、许多软体动物及海鞘类具有开放式循环系统(open circulatory system)，即血腔实际上是内脏器官之间的空隙，血液由心脏泵出，经过动脉进入开放的体液腔(血腔)，一般没有毛细血管，也没有静脉；开放式循环系统的血压都很低，一般不超过 5~10 mmHg(陈守良 1996)。开放式循环系统没有血液和组织液(interstitial fluid)之分。

脊椎动物、某些环节动物、软体动物的头足类、某些棘皮动物等具有封闭式循环系统(closed circulatory system)，即已形成一套连续的血管系统(包括心脏、动脉、毛细血管和静脉)，血液在这套管道(vessel)中循环，与组织液分离(陈守良 1996)。

从鳃(gill)循环到肺(pulmonary)循环的演变是脊椎动物心血管系统进化发展的重要标志之一(图 10-5)。与任何液体通过管道时一样，血液流动时，管壁的摩擦力必然降低由心施与血液的压力；因此，毛细血管网(在大部分组织内分布于动脉和静脉之间)自然成为循环管道系统中血压损失最大之处；随着血液循环从单循环到双循环的改变，循环效力得到提高的同时，也伴随着组织内血压的增高(Romer and Parsons 1977)。

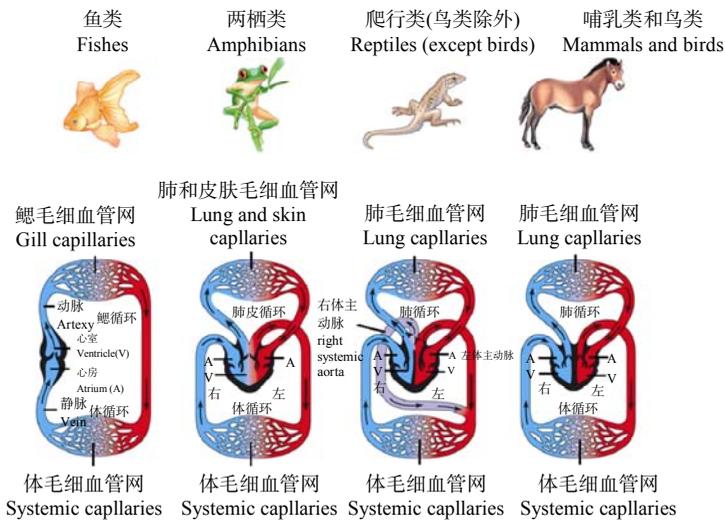


图 10-5 脊椎动物循环系统的比较(引自 Campbell and Reece 2005)  
 Fig. 10-5 A comparison of vertebrate circulatory systems  
 (Cited from Campbell and Reece 2005)

在一般鱼类，由心脏泵出的血液到达大动脉并由此到达身体各组织的毛细血管网之前，必须先经过鳃部毛细血管网，而在回心前，绝大部分血还要通过肝门脉系，因此，血需通过 3 个毛细血管网，每次都损失一部分血压。在两栖类成体，

由于肺循环的产生和鳃循环的消失，血离心后，不论到肺或大部分组织，都无需经过一个以上的毛细血管网而回心，只是到达身体后端或肠部的血，需再经过一个门脉系(肝或肾门脉系)，但这也只经过两个毛细血管网。肾门系在爬行类的退化和在鸟类哺乳类的消失，血液循环状况得到进一步改善；在哺乳类，到肠道的血需经过两个毛细血管网，而到其他各部的血直接由心来并直接回心，即只经过一个毛细血管网(Romer and Parsons 1977)。

在双循环的哺乳动物体内，肺循环的血压要比体循环的血压低。但单循环的鱼类则相反，鳃部血液循环的血压要比身体其他部分血液循环的血压高；由于血液由心脏泵出，经腹大动脉进入鳃动脉，血液进入鳃后经过鳃毛细血管进行气体交换，每侧的多条出鳃动脉先汇集成鳃上动脉，两侧的鳃上动脉再汇集成背大动脉(林浩然 1998)。这也就是为何鱼类腹大动脉的血压总是要高于背大动脉的缘故(表 10-2)。当血液进一步通过组织毛细血管网以及肾和肝门脉系(renal and hepatic portal system)时，血压进一步下降。

表 10-2 鱼类的血压  
Table 10-2 Blood pressure in fish

种类 Species	血压 Blood pressure /mmHg		文献 Reference
	背大动脉 Dorsal aorta	腹大动脉 Ventral aorta	
<b>软骨鱼 Elasmobranch</b>			
角鲨 Dogfish ( <i>Squalus</i> )	17~16	30~24	Metcalf and Butler 1982
	24~32	28~38	Satchell 1999
<b>硬骨鱼 Teleost</b>			
虹鳟 Rainbow trout ( <i>Salmo gairdneri</i> )	29~25	40~32	Stevens and Randall 1967
大西洋鲑鱼 Cod ( <i>Gadus morhua</i> )		29~18	Prosser 1973
金枪鱼 Tuna ( <i>Katsuwonus pelamis</i> )	85~80		Stevens 1972
隆头南极鱼 Antarctic cod ( <i>Notothenia gibberifrons</i> )	10~7		Holeton 1970
银鱼 Icefish ( <i>Chaeocephalus aceratus</i> )	17~11	20~12	Hemmingsen and Douglas 1977
七鳃鳗 Lamprey ( <i>Entosphenus tridentatus</i> )	32.4~18.4		Johansen et al. 1973
美洲鳗鲡 North American eel ( <i>Anguilla rostrata</i> )	24~28 <sup>1), 2)</sup>		Butler et al. 2003
湖鳟 Lake trout ( <i>Salvelinus namaycush</i> )	34±1 <sup>1)</sup>	45±1 <sup>1)</sup>	McKim et al. 1999
欧川鲽 Flounder ( <i>Platichthys flesus</i> )	31.3±1.0 <sup>1)</sup>		Warne and Balment 1997
鲫 Gold fish( <i>Carassius auratus</i> )	28~35 <sup>3)</sup>		姜礼燮等 2004

1) 平均血压 Mean blood pressure  
2) 根据图形的估算值 value estimated from figure  
3) 侧主动脉或鳃动脉 Lateral aorta or gill artery

鱼类的血压一般较陆生脊椎动物为低，因为鱼被水支撑着，不必像陆生脊椎动物那样需要较高的压力去克服较大的地球重力。

爬行类动物的平均动脉血压(mean systemic arterial blood pressure)为15~90 mmHg，但大部分在20~50 mmHg (Stinner and Ely 1993, Vera and Gonzalez 1997)。

人的动脉血压：心室收缩的中期主动脉内血压达到最高值，此时的血压称为收缩压(systolic pressure)，一般为100~120 mmHg；在心室舒张时主动脉压下降，心舒末期主动脉内压力最低，此时的血压称为舒张压(diastolic pressure)，一般为60~80 mmHg(岳利民 2002)。哺乳动物的血压(表 10-3)要显著高于鱼类。

表 10-3 哺乳动物的血压  
Table 10-3 Blood pressure of mammals

动物种类 Animal species	动物数与性别 Animal number and sex	麻醉情况 Anaesthesia	血压*Blood pressure (BP)*mmHg		
			收缩压 Systolic pressure	舒张压 Diastolic pressure	平均动脉压 Mean arterial pressure
猴 Monkey	14	不麻醉 No	159(137~188)	127(112~152)	
马 Horse	173♂	不麻醉 No	98(90~144)	64(46~86)	
	43♀	不麻醉 No	90(86~98)	59(43~84)	
	青年 5♂3♀	不麻醉 No	80/50		
牛 Cattle	—	不麻醉 No	134(124~166)	88(80~120)	
	青年 4	—			157(133~177)
山羊 Goat	—	不麻醉 No	120(112~136)	56(43~66)	
绵羊 Sheep	13	局部麻醉 Local			114(90~140)
猪 Pig	—	不麻醉 No	169(144~185)	108(98~120)	
狗 Dog	13	不麻醉 No	112(95~136)	56(43~66)	
	22	巴比妥钠 Yellow-jacket	149(108~189)	100(75~122)	
	67♂	巴比妥钠 Yellow-jacket			134(85~190)
	80♀	巴比妥钠 Yellow-jacket			125(60~170)
猫 Cat	5	巴比妥钠或乙醚 Yellow-jacket or aether	120/75		
	191♂	戴爱尔或氨基甲酸乙酯 Urethane			129(67~216)
	208♀	戴爱尔或氨基甲酸乙酯 Urethane			121(62~200)
兔 Rabbit	32	不麻醉 No	110(95~130)	80(60~90)	
豚鼠 Guinea pig	8	乙醚或巴比妥钠	77(28~140)	47(16~90)	

动物种类 Animal species	动物数与性别 Animal number and sex	麻醉情况 Anaesthesia	血压*Blood pressure (BP)* /mmHg		
			收缩压 Systolic pressure	舒张压 Diastolic pressure	平均动脉压 Mean arterial pressure
大鼠 Rat	124	Aether or Yellow-jacket 巴比妥钠	129(88~184)	91(58~145)	
		Yellow-jacket 不麻醉 No	98 (82~120)		
小鼠 Mouse	9	氨基甲酸酯或乙醚 Urethane or aether	119(95~125)	81(67~90)	
		青年 不麻醉 No	111(95~138)		
金黄地鼠 Golden hamster	—	巴比妥钠 Yellow-jacket			120~170

\* 平均值(范围) Mean (range)

(引自施新猷 1989)(Cited from Shi 1989)

由于 MC 导致动物死亡的重要原因之一是使肝组织血管损伤，因此，可以推测循环系统不发达、血压较低的低等动物比循环系统发达、血压较高的哺乳动物对 MC 的耐受性要强。这也就是为何在巴西 Carurau 透析中心，患者肝脏中的平均 MC 含量仅为 0.743(0.167~1.573)  $\mu\text{g/g DW}$  即大量死亡(Carmichael et al. 2001, Azevedo et al. 2002)，而在荷兰的 IJsselmeer 湖中存活的欧洲鲈和胡瓜鱼肝脏中的 MC 含量分别可达 194  $\mu\text{g/g AFDW}$  和 874  $\mu\text{g/g AFDW}$  (Ibelings et al. 2005)，在日本 Suwa 湖中存活的褶纹冠蚌和圆顶珠蚌肝胰腺中的 MC 含量分别可达 297  $\mu\text{g/g DW}$  和 420  $\mu\text{g/g DW}$  (Yokoyama and Park 2002)。可以想像，可能正是由于 MC 的这种特殊的毒理性质，即使水中的 MC 含量相当高，许多水生动物还可以存活，而可能会给陆生哺乳动物(如鸟类和人类)带来灾难性的后果。

## 九、MC 对人类健康的风险评价

有毒污染物的风险评价分为生态风险评价和健康风险评价，前者的主要对象是生态系统或其中的组分，而后者主要侧重于人群的健康风险；风险评价包括危害识别(结构-活性分析、离体试验、动物试验、流行病学)、暴露评价(暴露类型、水平、时间)、效应评价(生态效应、毒理学效应、剂量-效应关系)等(王晓栋 2004)。这里重点介绍与 MC 的健康风险评价有关的剂量-效应评价中的阈值计算方法。

## 1. 暴露途径

MC 进入人体的途径主要是通过饮水(口腔摄入), 少部分通过娱乐活动(包括口腔摄取和皮肤暴露); 另外有一小部分人群通过口服某些蓝藻类保健品(dietary supplement)而摄入 MC, 这些保健品中的 MC 含量未能得到很好控制(Health Canada 1999, Falconer et al. 1999)。还有一种特殊途径——静脉输入影响一些脆弱的透析患者(Carmichael et al. 2001, Azevedo et al. 2002)。此外, 我国民众大量消费淡水湖泊中的各种水产品(淡水鱼、虾、蟹、蚌、螺等), 最近的研究表明, 在太湖和巢湖等大型湖泊中, 有毒蓝藻水华大量暴发, 水产品种的 MC-RR 和 MC-LR 含量很高, 因此通过食用水产品而摄入 MC 的风险不容忽视(Xie et al. 2005, Chen et al. 2005, Chen and Xie 2005a, b)。通过皮肤接触来吸收 MC-LR 似乎不大可能, 因为 MC-LR 并不容易穿过细胞膜(Eriksson et al. 1990a)。无脊椎动物对溶解性 MC-LR 无积累(Prepas et al. 1997)或对 MC-LR 的接触毒性很低(Delaney and Milkins 1995, Metcalf et al. 2002)的实验结果间接证实了上述观点。然而, 一些比 MC-LR 更疏水的 MC 可能通过其他机制(如扩散)进入细胞膜(Kuiper-Goodman et al. 1999)。

需要指出的是, 由于 MC 是一些蓝藻所产的天然毒素, MC 对人类的影响程度或时间与水体中有毒蓝藻出现的季节性和丰度有关, 一般来说, 在温带气候带, 微囊藻水华通常持续 3~5 个月, 而在中纬度气候带(如澳大利亚), 微囊藻可能持续 6~10 个月(Falconer et al. 1999)。

## 2. 日容许摄入量

一般来说, 如果某种环境污染物低于一定水平, 生物有机体可以通过代谢和排泄作用对自身进行保护与修复功能, 因而不会产生毒害作用, 而当污染物浓度超过这一水平(阈值)时, 开始产生毒性效应。在风险评价中, 一般通过获得无可可见效应水平(no observed adverse effect level, NOAEL)或最低可见效应水平(lowest observed adverse effect level, LOAEL)来计算暴露限, 如日容许摄入量(tolerable daily intake, TDI)等(王晓栋 2004, Falconer et al. 1999)。TDI 指人对一种潜在的有害物质摄取后对其一生中健康的负面影响可以忽略不计的日摄入量。

为了得到一种有毒物质的 TDI 值, 最理想的情况是直接人获得, 但常常是这样的研究要么不足, 要么不存在。另一种方法是, 如果有足够的实验数据库, 可以从动物研究中获得 TDI, 但动物研究存在着主要缺点。不仅动物和人的敏感性存在差异, 而且不同实验动物以及同一种动物的不同品系也可能存在差异, 例如, 小白鼠腹腔注射 MC-LR 的 LD<sub>50</sub> 值可相差 6 倍(25~150 μg/kg BW)(Kuiper-Goodman et al. 1999); 通过口腔摄取(灌喂)MC-LR 途径得到某个品系的小白鼠 LD<sub>50</sub> 值为 5000 μg/kg BW (Fawell et al. 1994), 而另一品系的小白鼠的 LD<sub>50</sub> 值为

10 900  $\mu\text{g}/\text{kg BW}$ (Yoshida et al. 1997), 而大白鼠(rat)的  $\text{LD}_{50}$  更高(Fawell et al. 1994), 因此常常通过设定安全因子(safety factor)来处理这一不确定性。

许多天然毒素(包括蓝藻毒素)面临的一个问题是很难获得足够量的纯毒素来控制实验。而在一些研究中使用藻类抽提物来代替纯毒素, 其优点是更接近地模仿了真实的环境状况, 缺点是除非抽提物中所有毒素的种类与其浓度均被充分地描述清楚了, 否则将限制该实验对其他条件下的情景(scenarios)预测价值(Kuiper-Goodman et al. 1999)。

在用外推法(extrapolation)处理动物毒性试验结果时, 还必须考虑暴露途径的差异。许多毒物用静脉注射(i.v.)或腹腔注射(i.p.)的毒性远比口服途径大, 如小白鼠口服 MC-LR 的  $\text{LD}_{50}$  值比腹腔注射的  $\text{LD}_{50}$  值高出数十倍以上, 因而运用静脉注射和腹腔注射的操作方法所需的毒素少得多, 所获得的  $\text{LD}_{50}$  值虽能用于指示相对的急性毒性、为毒性机制提供信息以及可运用于生物检测(bioassay), 但很难用于预测口服摄取后的毒性。此外, 几种常见的 MC(MC-LR、MC-LA、MC-YR 和 MC-YM)的腹腔注射  $\text{LD}_{50}$  值相似, 而 MC-RR 要高近 10 倍, 由于不同 MC 之间疏水性和极性的不同, 还很难根据腹腔注射的结果来推测不同 MC 的口服服用的毒性差异(Kuiper-Goodman et al. 1999)。

在蓝藻及其毒素引起的人类和家畜的许多中毒事件中, 对微囊藻的报道最多, 因此, 有关微囊藻及其毒素 MC 的实验研究也最为广泛。大多数的 MC 化合物对动物和人类毒性的实验数据并不完全, 根据已有的数据仅容许推导出针对 MC-LR 的临时(provisional)TDI。但是这并不表明 MC-LR 是唯一有毒的 MC, 也不意味着其他 MC 毒性较小, 而仅仅反映缺乏毒理学数据(Kuiper-Goodman et al. 1999, Falconer et al. 1999)。实际上, MC 已超过 70 种(McElhiney and Lawton 2005), 在许多地区, MC-LR 并不是最常见的种类, 甚至都不在被检测出的 MC 之列(Falconer et al. 1999)。

### 3. WHO 确定的 MC-LR 的临时 TDI 值

由于大部分与 MC 有关的数据要么来自人群利用了含有蓝藻的饮用水而导致的伤害事件或者从实验动物得到的有限工作, 且目前 MC 对人类致癌性(carcinogenicity)的证据尚不足, 相关的动物证据也有限, 现在使用的 MC-LR 的 TDI 值是利用 LOAEL 或 NOAEL, 除以 WHO (1998)的“水质指南补遗”(the addendum to the guidelines for drinking water quality)中所描述的适当的安全或不确定因子而推导出来的(Kuiper-Goodman et al. 1999)。

1997 年, 世界卫生组织关于饮用水中化学物质的工作组会议(WHO 1997)在对 MC-LR 有关的文献进行分析后认为, Fawell 等(1994)用纯 MC-LR 通过灌喂的方式进行的为期 13 周的小白鼠毒性试验被认为是确定 MC-LR 指导值(a guideline value)最合适的依据。在该实验中, 共有 4 个灌喂剂量(每天 0  $\mu\text{g}/\text{kg BW}$ 、40  $\mu\text{g}/\text{kg BW}$ 、200  $\mu\text{g}/\text{kg BW}$  和 1000  $\mu\text{g}/\text{kg BW}$ ), 每组小白鼠有雌雄个体各 15

个；根据组织病理学及血清酶活性的变化得到 NOAEL 值为每天 40 μg/kg BW。在每天 200 μg/kg BW 剂量组，一些雌雄小白鼠的肝组织出现轻微变化，在每天 1000 μg/kg BW 剂量组，所有雄性个体和大部分雌性个体出现肝组织变化，包括慢性炎症(chronic inflammation)、肝细胞局灶性变性(focal degeneration)和胶体硫酸铁沉积(haemosiderin deposit)；在两个高剂量处理组的雄性个体中，血清转氨酶显著升高，血清 γ-谷胺酰转移酶显著降低，总血清蛋白和血清白蛋白的下降虽小但显著，而雌性个体仅在最高剂量组出现转氨酶的变化。为了将结果外推到人类，再设不确定因子(UP)为 1000、种内变异为 10、种间变异为 10、数据库的限制性为 10(特别是缺乏有关慢性毒性试验及致癌性试验的数据)，即得到针对 MC-LR 的临时性 TDI 值为每天 0.04 μg/kg BW。

这一 TDI 值也被 Falconer 等(1994)以猪为对象、将其饮用水中加入微囊藻的萃取物(至少含有 7 种 MC 的异构体，主要成分为 MC-YR)进行的 44 天毒性试验得出的 LOAEL 值为每天 100 μg/kg BW 结果所支持。在该实验中，5 头猪为一组，毒素投喂剂量根据小白鼠腹腔注射生物试验的潜力估算相当于每天 280 μg /kg BW、800 μg /kg BW 和 1310 μg /kg BW 的 MC (假设一个平均腹腔注射 LD<sub>50</sub> 相当于 100 μg/kg BW)，实验共持续了 44 天；所确定的 LOAEL 为每天 280 μg/kg BW，在两个高剂量水平普遍出现了肝损伤(表现在有明显的组织病理学和血清酶指标变化)；在最低的剂量水平，有一头猪被影响；萃取物的毒性潜力根据小白鼠腹腔注射 LD<sub>50</sub> 生物试验法、HPLC 分析及体外磷酸酶抑制试验(*in vitro* phosphatase inhibition assay)确定，根据 HPLC 所确定的 MC 异构体面积(与 MC-LR 标样对照)计算出 LOAEL 相当于每天 100 μg MC-LR kg/BW。将这一 LOAEL 值乘以总不确定因子 1500。这一确定因子包括：种内变异为 10、种间变异为 3(因为猪比啮齿动物更接近人类)，从 LOAEL 到 NOAEL 为 5(之所以未取 10，是考虑到在最低的剂量组及从推导的剂量——响应曲线的形状来看毒性效果的发生率低)及非终身暴露(less-than-lifetime exposure)为 10。这样推导出对 MC-LR 的临时性 TDI 值为每天 0.067 μg/kg BW。而这两个值中较低的值(每天 0.04 μg/kg BW)被用作临时的指导值(Kuiper-Goodman et al. 1999)。

设从水中摄取的 MC-LR 的比例系数(P)为 0.8，一个成年人平均每天喝水量为 2 L，及成年人的体重为 60 kg，那么 WHO(1998)提出的人类接触 MC-LR 的临时性指导值为：

$$\begin{aligned} & (\text{NOAEL} \times \text{wt} \times P) / (\text{UF} \times \text{日饮水量}) \\ & = [40 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d}) \times 60 \text{ kg} \times 0.8] / (1000 \times 2 \text{ L/d}) \\ & = 0.96 \mu\text{g/L} \approx 1 \mu\text{g/L} \end{aligned}$$

澳大利亚、新西兰、加拿大等制定了饮用水中的 MC-LR 标准，等同或略高于 WHO 的指导值(表 10-4)。新西兰同时提出包含一个促肿瘤因子的 0.1 μg/L 的标

准, Ueno 等(1996)根据中国东南沿海原发性肝癌与沟渠、小河及浅井水中藻毒素的可能关系, 建议使用<0.0 1 µg/L 的标准。中华人民共和国卫生部于 2001 年颁布了《生活饮用水卫生规范》, 1 µg MC-LR/L 的指导值被列入“生活饮用水水质非常规检验项目”。国家环保总局和国家质量监督检验检疫总局于 2002 年发布了《地表水环境质量标准》, 1 µg MC-LR/L 被列入“集中式生活饮用水地表水源地特定项目标准限值”。从表 10-4 还可以看出, 在蓝藻毒素中, 针对饮用水提出了官方指导值的仅有 MC-LR。只有美国俄勒冈州制定了藻类健康食品中的 MC-LR 标准。目前, 还没有制定水产品中 MC 的指导值。

表 10-4 基于健康的关于蓝藻毒素暴露的指导值

Table 10-4 Summary of cyanotoxin health-based exposure guidelines

蓝藻毒素 Cyanotoxin	组织或国家 Organization or countries	最大可接受浓度 Maximum acceptable concentration
<b>肝毒素 Hepatotoxin</b>		
微囊藻毒素 MC	世界卫生组织 WHO	1.0 µg/L
	澳大利亚 Australia	1.3 µg/L <sup>1)</sup>
	加拿大 Canada	1.5 µg/L <sup>2)</sup>
	新西兰 New Zealand	1.0 µg/L, 0.1 µg/L <sup>3)</sup>
	中国 China	1.0 µg/L
	美国俄勒冈州 Oregon, USA	1.0 µg/g <sup>4)</sup>
节球藻毒素 Nodularin	无指导值, 因该毒素仅在咸淡水中出现, 虽然其存在应该被视为健康威胁 No guideline have been set as this toxin is found only in brackish waters, although its presence should be regarded as a health risk	
<b>细胞毒性 Cytotoxic</b>		
拟柱胞藻毒素 Clindrospermopsin	无官方指导值, 基于可能的遗传毒性, 建议指导值 1.0 µg/L No official guidelines; suggested guideline of 1.0 µg/L based on suspected genotoxicity	
<b>神经毒素 Neurotoxin</b>		
类毒素 Anatoxin	无官方指导值, 类毒素-a 的建议指导值 3 µg/L No official guidelines, but anatoxin-a has a suggested guideline value of 3µg/L	
石房蛤毒素 Saxitoxin	无官方指导值, 但是根据剧毒性, 澳大利亚正在考虑采用 3 µg 石房蛤毒素/L 的指导值, 这一毒素水平大约等同于细胞密度>20 000 个/mL No official guidelines, but Australia is considering a 3 µg saxitoxin-equivalent/L be used based upon data from shellfish toxicity; this toxin level could be associated with cell counts of above 20 000 cells/mL	

1) 总的(细胞外+细胞内)MC-LReq, 即根据毒性大小, 将 MC 的其他异构体换算成 MCeq, 然后合计 As total (free plus cell-bound) MC-LR toxicity equivalent, i.e., variants are converted to equivalent MC-LR toxicity and summed

2) 总 MC-LR (细胞外细胞内) Total MC-LR (free plus cell-bound)

3) 包括一个促肿瘤因子 Including a tumour-promotion factor

4) 藻类健康食品 Algae health food product

(引自 Svreck and Smith 2004, 中国的指导值来自国家环境保护总局 2002)(Cited from Svreck and Smith 2004, with guideline value of China from State Environmental Protection Administration of China 2002)

## 主要参考文献

- 陈少莲. 1990. 鱼类及其在水体的物质循环中的作用. 见: 刘建康. 东湖生态学研究(一). 北京: 科学出版社, 292~378
- 陈守良. 1996. 动物生理学(第二版). 北京: 北京大学出版社
- 国家环境保护总局. 2002. 地表水环境质量标准(GB3838-2002) State Environmental Protection Administration of China (SEPA) 2002. Environmental quality standards for surface water (GB 3838-2002)
- 何家菀, 何振荣, 俞敏娟. 1990. 蓝藻有毒“水华”种类组成及其毒素的分离提纯和鉴定. 见: 刘建康. 东湖生态学研究(一). 北京: 科学出版社, 395~403
- 湖北省水生生物研究所鱼类研究室. 1976. 长江鱼类. 北京: 科学出版社
- 姜礼燧, 樊俊峰, 宗网华. 2004. 鱼类高血压的危害及防治初探. 内陆水产, 1: 44~45
- 李思忠, 方芳. 1990. 鲢、鳙、青、草鱼地理分布的研究. 动物学报, 36: 244~250
- 李芑. 1996. 常用药物动力学术语及参数简介. 见: 李芑. 实用临床药物动力学. 成都: 四川大学出版社, 12~33
- 李新正, 刘瑞玉, 梁象秋. 2003. 中国长臂虾总科的动物地理学特点. 生物多样性, 11: 393~406
- 林浩然. 1998. 鱼类生理学. 广州: 广东高等教育出版社
- 刘昌孝, 刘定永. 1984. 药物动力学概论. 北京: 中国学术出版社
- 刘昌孝. 2004. 药物动力学. 见: 孙瑞元, 郑青山. 数学药理学新论. 北京: 人民卫生出版社, 213~308
- 刘国诠, 余兆楼. 2001. 色谱柱技术. 北京: 化学工业出版社
- 刘建康, 何碧梧. 1992. 中国淡水鱼类养殖学(第三版). 北京: 中国学术出版社
- 刘卫军, 沈瑛, 丁健. 2003. 蛋白磷酸酶 2A 的结构、功能和活性调节. 生物化学与生物物理学报, 35: 105~112
- 刘月英, 张文珍, 王耀先. 1993. 医学贝类学. 北京: 海洋出版社
- 穆丽娜, 俞顺章, 赵金扣等. 2001. 微囊藻毒素对小学生健康影响的流行病学研究. 中国公共卫生, 17: 799~801
- 欧阳平凯, 胡永红. 2003. 生物分离原理及技术. 北京: 化学工业出版社
- 齐钟彦. 1996. 中国经济软体动物. 北京: 中国农业出版社
- 荣国斌, 苏克曼. 2000. 大学有机化学基础. 上海: 华东理工大学出版社/化学工业出版社
- 桑国卫. 2001. 药代动力学基本原理与计算方法. 见: 李家泰. 临床药理学(第二版). 北京: 人民卫生出版社, 105~169
- 盛龙生, 何丽一, 徐连连, 沈文斌. 2003. 药物分析. 北京: 化学工业出版社
- 施炜钢, 严小梅, 邴旭文. 1995. 太湖秀丽白虾生物学与食性的研究. 湖泊科学, 7: 69~76
- 施新猷. 1989. 医用实验动物学. 西安: 陕西科学技术出版社
- 孙昌盛, 陈华, 薛常镛, 陈建玲, 康天尝, 陈铁晖, 洪作艺. 2000. 同安水环境藻类与藻类毒素分布调查. 中国公共卫生, 16: 147~148
- 孙建勋, 张道源, 谭德清, 段中华. 1999. 洪湖日本沼虾种群生长的研究. 湖泊科学, 11: 149~154
- 田村保. 1977. 鱼类生理学概论. 东京(日文): 恒星社厚生阁
- 王连生. 2004. 有机污染化学. 北京: 高等教育出版社
- 王少云. 2002. 免疫分析. 见: 张君仁, 臧恒昌. 体内药物分析. 北京: 化学工业出版社, 77~98
- 王晓栋. 2004. 有毒化学品的风险评价. 见: 王连生. 有机污染化学. 北京: 高等教育出版社, 866~915
- 吴冬辉, 沈联芳, 何振荣, 俞敏娟. 1994. 程海微囊藻毒素的结构分析. 环境科学学报, 14: 56~63
- 伍献文. 1982. 中国鲤科鱼类志(下卷). 上海: 上海科学技术出版社
- 谢平. 2003. 鲢、鳙与藻类水华控制. 北京: 科学出版社
- 于世林. 2000. 高效液相色谱方法及应用. 北京: 化学工业出版社
- 俞顺章, 赵宁, 资晓林, 陈刚, 董传辉, 连民, 刘颖, 穆丽娜. 2001. 饮水中微囊藻毒素与我国原发性肝癌关系的研究. 中华肿瘤杂志, 23: 96~99
- 岳利民. 2002. 生理学. 北京: 科学出版社
- 张君仁, 臧恒昌. 2002. 体内药物分析. 北京: 化学工业出版社
- 中国科学院水生生物研究所和上海自然博物馆. 1982. 中国淡水鱼类原色图谱(一). 上海: 上海科学技术出版社
- 周学富, 董传辉, 俞顺章. 1999. 泰安地区肝癌高发因素研究. 现代预防医学, 26: 350~351

- 朱蕙, 邓文瑾. 1983. 鱼类对藻类消化吸收的研究(II)鲢、鳙对微囊藻和裸藻的消化吸收. 鱼类学论文集, 3: 77-91
- Adams W H, Stone J P, Sylvester B, Stoner R D, Slatkin D N, Tempel N R and Siegelman H W. 1988. Pathophysiology of cyanoginosin-LR: *in vivo* and *in vitro* studies. *Toxic. Appl. Pharmac.* 96: 248-257
- Amorim A and Vasconcelos M. 1999. Dynamics of microcystins in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon*, 37: 1041-1052
- Amorim A. 1997. Accumulation and depuration of microcystins by *Mytilus galloprovincialis* Lamark. M. Sc. Thesis (in Portuguese), Porto University, 52
- Andersen R J, Luu H A, Chen D Z X, Holmes C F B, Kent M L, LeBlance M, Taylor F J R and Williams D E. 1993. Chemical and biological evidence links microcystins to salmon net-pen liver disease. *Toxicon*, 31: 1315-1323
- Azevedo S M F O, Carmichael W W, Jochimsen E M, Rinehart K L, Lau S, Shaw G R and Eaglesham G K. 2002. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. *Toxicology*, 181/182: 441-446
- Babcock-Jackson L, Carmichael W W and Culver D A. 2002. Dreissenid mussels increase exposure of benthic and pelagic organisms to toxic microcystins. *Ver. Internat. Verein. Limnol*, 28: 1082-1085
- Bagu J R, Sonnichsen F D, Williams D E, Andersen R J, Sykes B D and Holmes C F B. 1995. Comparison of the solution structures of microcystin-LR and motuporin. *Nat. Struct. Biol*, 2: 114-116
- Bagu J R, Sykes B D, Craig M M and Holmes C F B. 1997. A molecular basis for different interactions of marine toxins with protein phosphatase-1. Molecular models for bound motuporin, microcystins, okadaic acid, and calyculin a. *J. Biol. Chem*, 272: 5087-5097
- Baldia S F, Pagador G E, Kawai K, Nishijima T and Harada K. 2002. Effects of Microcystin-LR, a cyclic heptapeptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, on the freshwater ornamental fish *Carassius auratus*. 5th International Symposium on Sediment Quality Assessment. October 16-18, 2002, Chicago, Illinois, USA (Abstract)
- Barreto V, Lira V, Figueiredo J, Fittipaldi H, Juca N, Gayotto L C, Raposo F, Barbosa J, Holmes C, Cardo D, Azevedo S and Carmichael W W. 1996. Caruaru syndrome—a previously undescribed form of acute toxic liver-disease in humans caused by microcystin-LR with a high lethality rate. *Hepatology*, 24: 244
- Beveridge M C M and Baird D J. 2000. Chapter three: diet, feeding and digestive physiology. In: Beveridge M C M and McAndrew B J. *Tilapias: biology and exploitation*. 59-87. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London
- Beveridge M C M, Baird D J, Rahmatullah S M, Lawton L A, Beattie K A and Codd G A. 1993. Grazing rates on toxic and non-toxic strains of cyanobacteria by *Hypophthalmichthys molitrix* and *Oreochromis niloticus*. *J. Fish Biol.* 43: 901-907
- Botes D P, Tuinman A A, Wessels P L, Viljoen C C, Kruger H, Williams D H, Santikarn S, Smith R J and Hammond S J. 1984. The structure of cyanoginosin-LA, a cyclic heptapeptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *J. Chem. Society Perkin. Trans.*, 1: 2311-2318
- Botes D P, Wessels P L, Kruger H, Runnegar M T C, Santikarn S, Smith R J, Barna J C J and Williams D H. 1985. Structural studies on -LR, cyanoginosins-YR, cyanoginosins-YA, and cyanoginosins -YM, peptide toxins of *Microcystis aeruginosa*. *J. Chem. Society Perkin. Trans.*, 1: 2747-2748
- Briand J F, Jacquet S, Bernard C and Humbert J F. 2003. Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *Vet. Res.*, 34: 361-377
- Brooks W P and Codd G A. 1987. Distribution of *Microcystis aeruginosa* peptide toxin and interactions with hepatic microsomes in mice. *Pharmacol. Toxicol.*, 60: 187-191
- Bury N R, McGeer J C, Eddy F B and Codd G A. 1997. Liver damage in brown trout, *Salmo trutta* L., and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), following administration of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR via the dorsal aorta. *J. Fish Dis.*, 20: 209-215
- Bury N R, Newlands A D, Eddy F B and Codd G A. 1998. *In vivo* and *in vitro* intestinal transport of 3H-microcystin-LR, a cyanobacterial toxin, in a rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.*, 42: 139-148
- Butler D G, Zhang D H, Villadiego R, Oudit G. Y, Youson J H and Cadinouche M Z A. 2003. Response by the corpuscles of Stannius to hypotensive stimuli in three divergent ray-finned fishes (*Amia calva*, *Anguilla rostrata*, and *Catostomus commersoni*): cardiovascular and morphological changes. *Gen. Comp. Endocrin.*, 132: 198-208

- Byth S. 1980. Palm Island mystery disease. *Med. J. Aust.*, 2: 40~42
- Campbell N A and Reece J B. 2005. *Biology*, 7<sup>th</sup> Ed. Benjamin Cummings Publishing Co., San Francisco
- Carmichael W W and Falconer I R. 1993. Diseases related to freshwater blue-green algal toxins, and control measures. In: Falconer I R *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*. London, Academic Press, 187~209
- Carmichael W W, Azevedo S M F O, An J S, Molica R J R, Jochimsen E M, Lau S, Rinehart K L, Shaw G R and Eaglesham G K. 2001. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environ. Health Perspect*, 109: 663~668
- Carmichael W W, Beasley V R, Bunner D L, Eloff J N, Falconer I, Gorham P, Harada K I, Krishnamurthy T, Yu M J, More R E, Rinehart K, Runnegar M, Skulberg O M and Watanabe M. 1988. Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). *Toxicon*, 26: 971~973
- Carmichael W W. 1992. Cyanobacteria secondary metabolites—the cyanotoxins. *J. Appl. Bact.*, 72: 445~459
- Carmichael W W. 1994. The toxins of cyanobacteria. *Sci. American*. January: 78~86
- Carmichael W W. 1997. The cyanotoxins. In: Callow J A. *Advances in Botanical Research*, 27: 211~256. Academic Press, London, UK
- Carmichael W W. 2001. Health effects of toxin-producing cyanobacteria: “the CyanoHABS”. *Human Ecol. Risk Assess*, 7: 1393~1407
- Cazenave J, Wunderlin D A, Bistoni M A, Amé M V, Krause E, Pflugmacher S and Wiegand C. 2005. Uptake, tissue distribution and accumulation of Microcystin-RR in *Corydoras paleatus*, *Jenynsia multidentata* and *Odontesthes bonariensis*. *Aquat. Toxicol.*, 75: 178~190
- Chang R. 1981. *Physical Chemistry with Applications to Biological Systems*. MacMillan Publishing Co. Inc, New York, USA.
- Chen D Z X, Boland M P, Smillie M A, Klix H, Ptak C, Andersen R J and Holmes C F B. 1993. Identification of protein phosphatase inhibitors of the microcystins class in the marine environment. *Toxicon*, 31: 1407~1414
- Chen J and Xie P. 2005a. Tissue distributions and seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins-LR and -RR in two freshwater shrimps, *Palaemon modestus* and *Macrobrachium nipponensis*, from a large shallow, eutrophic lake of the subtropical China. *Toxicon*, 45: 615~625
- Chen J and Xie P. 2005b. Seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins in various organs of four freshwater bivalves from the large eutrophic Lake Taihu of the subtropical China and the risk to human consumption. *Environ Toxicol.*, 20: 572~584
- Chen J and Xie P. 2006. Microcystin accumulation in freshwater bivalves from a large Chinese lake and the potential risk to human consumption. *Ecotox Environ Safe* (in press).
- Chen J, Xie P, Guo L G, Zheng L and Ni L Y. 2005. Tissue distributions and seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins -LR and -RR in a freshwater snail (*Bellamya aeruginosa*) from a large shallow, eutrophic lake of the subtropical China. *Environ. Pollut.*, 134: 423~430
- Chen J, Xie P, Zhang D, Liang G D and Lei H H. 2006. In situ studies on the distribution patterns and dynamics of microcystins in a biomanipulation fish—bighead carp (*Aristichthys nobilis*). *Environ Pollut.* (in press)
- Choi B W, Namikoshi M, Sun F, Rinehart K L, Carmichael W W, Kaup A M, Evans W R and Beasley V R. 1993. Isolation of linear peptides related to the hepatotoxins nodularin and microcystins. *Tetrahedron Lett.*, 34: 7881~7884
- Chorus I and Bartram J. 1999. *Toxic Cyanobacteria in Water, A Guid to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. E & FN Spon, London and New York
- Chu F S, Huang X, Wei R D and Carmichael W W. 1989. Production and characterization of antibodies against microcystins. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55: 1928~1933
- Codd G A and Bell S G. 1996a. Production and Fate of Cyanobacterial (Blue Green Algal) Hepatotoxins. National Rivers Authority, Peterborough, UK, 162
- Codd G A and Bell S G. 1996b. The Occurrence and Fate of Blue-Green Algal Toxins in Freshwaters. London, Her Majesty's Stationery Office (National Rivers Authority R and D Report 29)
- Codd G A, Morrison L F and Metcalf J S. 2005. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicol.*

- Codd G A. 1995. Cyanobacterial toxins: occurrence, properties and biological significance. *Wat. Sci. Technol.*, 32: 149~156
- Codd G A. 2000. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritization of eutrophication control. *Ecol. Eng.*, 16: 51~60
- Cohen P. 1989. The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.*, 58:453~508
- Cousins I T, Bealing D J, James H A and Sutton A. 1996. Biodegradation of microcystins-LR by indigenous mixed bacterial populations. *Wat Res.*, 30: 481~485
- Craig M, Luu H A, McCready T, Williams D E, Andersen R J and Holmes C F B. 1996. Molecular mechanisms underlying the interaction of motuporin and microcystins with type-1 and 2A protein phosphatases. *Biochem. Cell Biol.*, 74: 569~578
- Craig M, McCready T, Luu H A, Smillie M A, Dubord P and Holmes C F B. 1993. Identification and characterization of hydrophobic microcystins in Canadian freshwater cyanobacteria. *Toxicon*, 31: 1541~1549
- Dabholkar A S and Carmichael W W. 1987. Ultrastructural changes in the mouse liver induced by hepatotoxin from freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* strain 7820. *Toxicon*, 25: 285~282
- Dahlem A M, Hassan A S, Swanson S P, Carmichael W W and Beasley V R. 1989. A model system for studying the bioavailability of intestinally administered microcystin-LR, a hepatotoxic peptide from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Pharmacol. Toxicol.*, 64: 177~181
- Damain H B, Thom T J and Lucas M C. 2004. Movement and dispersal of the invasive signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* in upland rivers. *Freshwat. Biol.*, 49: 357~368
- Dawson J F and Holmes C F. 1999. Molecular mechanisms underlying inhibition of protein phosphatases by marine toxins. *Front. Biosci.*, 4: d646~658
- Dawson R M. 1998. The toxicology of microcystins. *Toxicon*, 36: 953~962
- De Maagd P G-J, Hendriks A J, Seinen W, Sijm D T H M. 1999. pH-dependent hydrophobicity of the cyanobacteria toxin microcystin-LR. *Water Res.*, 33: 677~680
- Delaney J M and Wilkins R M. 1995. Toxicity of microcystin-LR, isolated from *Microcystis aeruginosa*, against various insect species. *Toxicon*, 33: 771~778
- Dittmann E, Neilan B, Erhard M, von Döhren H, Börner T. 1997. Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Mol. Microbiol.*, 26:779~787
- Elghobashy H. 2001. Aquaculture genetics research in Egypt. In: Gupta M V and Acosta B O. Fish genetics research in member countries and institutions of the International Network on Genetics in Aquaculture. ICLARM Conf. Proc., 64: 29~34
- Ellis A E, Roberts R J and Tytler P. 1978. The anatomy and physiology of teleosts. In: Fish Anatomy. 13~54 (Roberts R J), Bailliere Tindall, London
- Eriksson J E, Gronberg L, Nygard S, Slotte J P and Meriluoto J A O. 1990. Hepatocellular uptake of <sup>3</sup>H-dihydropicrocystin-LR, a cyclic peptide toxin. *Biochem. Biophys. Acta*, 1025: 60~66
- Eriksson J E, Hägerstrand H and Isomaa B. 1987. Cell selective cytotoxicity of a peptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Biochim. Biophys. Acta*, 930: 304~310
- Eriksson J E, Meriluoto J A O and Lindholm T. 1989. Accumulation of a peptide toxin from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii* in the freshwater mussel *Anodonta cygnea*. *Hydrobiologia*, 183: 211~216
- Eriksson J E, Paatero G I L, Meriluoto J A O, Codd G A, Kass G E N, Nicotera P and Orrenius S. 1989b. Rapid microfilament reorganization induced in isolated rat hepatocytes by microcystins-LR, a cyclic peptide toxin. *Exp. Cell. Res.*, 185: 86~100
- Eriksson J E, Toivola D, Meriluoto J A O, Karaki H, Han Y G and Hartshorne D. 1990b. Hepatocyte deformation induced by cyanobacterial toxins reflects inhibition of protein phosphatases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 173: 1347~1353

- Ernst B, Dietz L, Hoeger S J and Dietrich D R. 2005. Recovery of MC-LR in fish liver tissue. *Environ. Toxicol.*, 20: 449–458
- Falconer I R and Runnegar M T C. 1987. Effects of the peptide toxin from *Microcystis aeruginosa* on intracellular calcium, pH and membrane integrity in mammalian cells. *Chem.-Biol. Interact.*, 63: 215–225
- Falconer I R, Beresford A M and Runnegar M T C. 1983. Evidence of liver damage by toxin from a bloom of the blue-green alga, *Microcystis aeruginosa*. *Med. J. Aust.*, 1: 511–514
- Falconer I R, Buckley T and Runnegar M T. 1986. Biological half-life, organ distribution and excretion of 125-I-labelled toxic peptide from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Aust. J. Biol. Sci.*, 39: 17–21
- Falconer I R, Burch M D, Steffensen D A, Choice M and Coverdale O R. 1994. Toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Microcystis aeruginosa* in drinking water to growing pigs, as an animal mode for human injury and risk assessment. *J. Environ. Toxicol. Water Qual.*, 9: 131–139
- Falconer I R, Dornbusch M, Moran G and Yeung S K. 1992. Effect of the cyanobacterial (blue-green algal) toxins from *Microcystis aeruginosa* on isolated enterocytes from the chicken small intestine. *Toxicol.*, 30: 790–793
- Falconer I R, Jackson A R B, Langley J and Runnegar M T. 1981. Liver pathology in mice in poisoning by the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Aust. J. Biol. Sci.*, 34: 179–187
- Falconer I, Bartram J, Chorus I, Kuiper-Goodman T, Utkilen H, Burch M and Codd G A. 1999. Safe levels and safe practices. In: Chorus I and Bartram J. *Toxic Cyanobacteria in Water, A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. E & FN Spon, London and New York. 155–178
- Falconer I. 1991. Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria. *Environ. Toxicol. Water Qual.*, 6: 177–184
- FAO. 2000. *The State of World Fisheries and Aquaculture*. FAO Fisheries Department, FAO, Rome
- FAO. 2001. *1999 Fisheries Statistics: Aquaculture Production Vol. 88/2*, FAO, Rome
- Fawell J K, James C P and James H A. 1993. Blue-green algae and their toxins: analysis, toxicity, treatment, and environmental control. *Wat. Supply*, 11: 109–121
- Fawell J K, James C P and James H A. 1994. *Toxins from Blue-Green Algae: Toxicological Assessment of Microcystin-LR and a Method for Its Determination in Water*. Water Research Centre, Medmenham, UK, 1–46
- Fawell J K, Mitchell R E, Everett D J and Hill R E. 1999. The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse. Part I. Microcystin-LR. *Hum. Exp. Toxicol.*, 18: 162–167
- Franz D R. 1997. Defense against toxin weapons. U.S. Army Medical Research Institute of Infectious Diseases (USAMRIID) (<http://www.usamriid.army.mil/education/defensetox.html>)
- Frederick W A. 1981. Intestinal transport of bile acids. *Am. J. Physiol.*, 241: G83–G92
- Geyer H J, Scheunert I and Korte F. 1987. Correlation between the bioconcentration potential of organic environmental chemicals in humans and their n-octanol/water partition coefficients. *Chemosphere*, 16: 239–252
- Gingerich W H. 1982. Hepatic toxicology of fishes. In: Weber L J. *Aquatic Toxicology*. Raven Press, New York. 55–105
- Goldberg J, Huang H, Kwon Y, Greengard P, Nairn A C and Kuriyan J. 1995. Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1. *Nature*, 376: 745–753
- Griffiths D J, Saker M L and Hawkins P R. 1998. Cyanobacteria in a small tropical reservoir. *Water J. Aust. Water Wastewater Assoc.*, 25: 14–19
- Gupta N, Pant S C, Vijayaraghavan R and Lakshmana Rao P V. 2003. Comparative toxicity evaluation of cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin variants(LR, RR, YR) in mice. *Toxicology*, 188: 285 ~ 296
- Gurgel J J S and Fernando C H. 1994. Fisheries in semi-arid Northeast Brazil with special reference to the role of tilapias. *Int. Revue ges. Hydrobiol.*, 79: 77–94
- Harada K I, Matsuura K, Suzuki M, Watanabe M F, Oishi S, Dahlem A M, Beasley V R and Carmichael W W. 1990. Isolation and characterization of the minor components associated with microcystins LR and RR in the cyanobacterium (blue-green algae). *Toxicol.*, 28: 55–64
- Harada K I, Murata H, Qiang Z, Suzuki M and Kondo F. 1996. Mass spectrometric screening method for microcystins in cyanobacteria. *Toxicol.*, 34: 701–710

- Harada K I, Ogawa K, Matsuura K, Murata H, Suzuki M, Watanabe M F, Itezo Y and Nakayama N. 1990. Structural determination of geometrical isomers of microcystins LR and RR from cyanobacteria by two dimensional NMR spectroscopic techniques. *Chem. Res. Toxicol.*, 3: 473–481
- Harada K I, Tsuji K, Watanabe M F and Kondo F. 1996. Stability of microcystins from cyanobacteria. III. Effect of pH and temperature. *Phycologia*, 35: 83–88
- Harada K, Kondo F and Lawton L. 1999. Chapter 13. Laboratory analysis of cyanotoxins. In Chorus I and Bartram J. (eds.): *Toxic Cyanobacteria in Water-A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. E & FN Spon, 369–405
- Hashimoto Y. 1979. *Marine Toxins and Other Bioactive Marine Metabolites*. Japan Scientific Societies Press, Tokyo 53–55
- Health Canada. 1999. Warning: Toxins may be present in blue-green algae products. [http://www.hc-sc.gc.ca/english/protection/warnings/1999/99\\_69e.htm](http://www.hc-sc.gc.ca/english/protection/warnings/1999/99_69e.htm)
- Hemmingsen E A and Douglas E L. 1977. Respiratory and circulatory adaptations in the absence of hemoglobin in Chaenichthyid fishes. In: *Adaptation within Antarctic Ecosystems* (edited by Llano G A) Gulf Publishing, Houston, 479–487
- Hermansky S J, Wolff S N and Stohs S J. 1990. Use of rifampin as an effective chemoprotectant and antidote against microcystins-LR toxicity. *Pharmacology*, 41: 231–236
- Hilborn E D, Carmichael W W, Yuan M and Azevedo S M F O. 2005. A simple colorimetric method to detect biological evidence of human exposure to microcystins. *Toxicol.*, 46: 218–221
- Hindman S H, Favero M, Carson L A, Peterson N J, Schonberger L B and Solans J T. 1975. Pyrogenic reaction during haemodialysis caused by extramural endotoxin. *Lancet*, 2: 731–732
- Hitzfeld B C, Höger S J and Dietrich D R. 2000. Cyanobacterial Toxins: Removal during Drinking Water Treatment, and Human Risk Assessment. *Environ. Health Perspect.*, 108 (Suppl.) 1: 113–122
- Holeton G F. 1970. Oxygen uptake and circulation by a hemoglobinless Antarctic fish (*Chaenocephalus aceratus* Lonnberg) compared with three red-blooded Antarctic fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 34: 457–471
- Honkanen R E, Codisoti B A, Tse K and Boynton A L. 1994. Characterization of natural toxins with inhibitory activity against serine/threonine protein phosphatases. *Toxicol.*, 32: 339–350
- Honkanen R E, Zwiller J, Moore R E, Daily S L, Khatra B S, Dukelow M and Boynton A L. 1990. Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. *J. Biol. Chem.*, 265:19401–19404
- Hooser S B, Beasley V R, Lovell R A, Carmichael W W and Haschek W M. 1989. Toxicity of microcystin-LR, a cyclic heptapeptide hepatotoxin from *Microcystis aeruginosa*. *Vet. Path.*, 26: 246–252
- Hooser S B, Kuhlenschmidt M S, Dahlem M S, Beasley V R, Carmichael W W and Haschek W M. 1991. Uptake and subcellular localization of tritiated dihydromicrocystin-LR in rat liver. *Toxicol.*, 29: 589–601
- Ibelings B W, Bruning K, Jonge J De, Wolfstein K, Pires L M D, Postma J and Burger T. 2005. Distribution of microcystins in a lake foodweb: no evidence for biomanipulation. *Microb. Ecol.*, 49: 487–500
- Ikawa M, Phillips N, Haney J F and Sasner J J. 1999. Interference by plastic additives in the HPLC determination of -LR and microcystins-YR. *Toxicol.*, 37: 923–929
- Jang M H, Ha K, Lucas M C, Joo G J and Takamura N. 2004. Changes in microcystins production by *Microcystis aeruginosa* exposed to phytoplanktivorous and omnivorous fish. *Aquat. Toxicol.*, 68: 51–59
- Jochimsen E M, Carmichael W W, An J S, Cardo D M, Cookson S T, Holmes C E M, Antunes M D de C, de Melo Filho D A, Lyra T M, Barreto C S V, Azevedo S M F O and Jarvis W R. 1998. Liver failure and death after exposure to microcystins at a haemodialysis center in Brazil. *New Engl. J. Med.*, 338: 873–878
- Johansen K, Lenfant C and Hanson D. 1973. Gas exchange in the lamprey, *Entosphenus tridentatus*. *Comp. Biochem. Phys.*, 44A: 107–119
- Kenaga E and Goring C. 1980. Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning, and concentration of chemicals in biota. In: *Eaton J, Parrish P and Hendricks. Aquatic Toxicol ASTM USA*. 78
- Kfir R, Johannsen E and Botes D P. 1986. Monoclonal antibodies specific for cyanoginosin-LA: preparation and

- characterization. *Toxicol.*, 24:543–552
- Koland J G. 2005. Principle of pharmacokinetics. College of Pharmacy, University of Iowa, USA, unpublished note, 32
- Kondo F, Matsumoto H, Yamada S, Ishikawa N, Ito E, Nagata S, Ueno Y, Suzuki M and Harada K-I. 1996. Detection and identification of metabolites of microcystins formed *in vivo* in mouse and rat livers. *Chem. Res. Toxicol.*, 9: 1355–1359
- Kotak B G, Hrudey S E, Kenefick S L and Prepas E E. 1993a. Toxicity of cyanobacterial blooms in Albert lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci. Tech. Rep.*, 1942: 172–179
- Kotak B G, Kenefick S L, Fritz D L, Rousseaux C G, Prepas E E and Hrudey S E. 1993b. Occurrence and toxicological evaluation of cyanobacterial toxins in Alberta lakes and farm dugouts. *Water Res.*, 27: 495–506
- Kotak B G, Semalulu S, Fritz D L, Prepas E, Hrudey S E and Coppock R W. 1996a. Hepatic and renal pathology of intraperitoneally administered microcystin-LR in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicol.*, 34: 517–525
- Kotak B G, Zurawell R W, Prepas E E and Holmes C F B. 1996b. Microcystin-LR concentration in aquatic food web compartments from lakes of varying trophic status. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 53: 1974–1985
- Krishnamurthy T, Carmichael WW and Sarver E R. 1986. Toxic peptides from freshwater cyanobacteria (blue-green algae). I. Isolation, purification and characterization of peptides from *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena flosaquae*. *Toxicol.*, 24: 865–873
- Kuiper-Goodman T, Falconer I and Fitzgerald J. 1999. Human health aspects. In: Chorus I and Bartram J. *Toxic Cyanobacteria in Water, A Guid to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. E & FN Spon, London and New York. 113–153
- Lack L and Weiner I M. 1973. Bile salt transport systems. In: Nair P P, Kirchevsky D. *The Bile Acids: Chemistry, Physiology and Metabolism*. Plenum, New York, 33–54
- Lawrence J and Menard C. 2001. Determination of microcystins in blue-green algae, fish and water using liquid chromatography with ultraviolet detection after sample clean-up employing immunoaffinity chromatography. *J. Chromatogr.*, 922: 111–117
- Lawton L A, Edwards C and Codd G A. 1994. Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. *Analyst*, 119: 1525–1530
- Lawton L A, Edwards C, Beattie K A, Pleasance S, Dear G J and Codd G A. 1995. Isolation and characterization of microcystins from laboratory cultures and environmental samples of *Microcystis aeruginosa* and from an associated animal toxicosis. *Nat. Toxins*, 3: 50–57
- Li L, Xie P and Chen J. 2005. *In vivo* studies on toxin accumulation in liver and ultrastructural changes of the hepatocytes of the phytoplanktivorous bighead carp i.p.-injected with extracted microcystins. *Toxicol.*, 46:533–545
- Li X Y, Chung I K, Kim J I and Lee J A. 2004. Subchronic oral toxicity of microcystin in common carp (*Cyprinus carpio* L.) exposed to *Microcystis* under laboratory conditions. *Toxicol.*, 44: 821–827
- Lin J R and Chu F S. 1994. Kinetics of distribution of microcystin-LR in serum and liver cytosol of mice: an immunochemical analysis. *J. Agric. Food Chem.*, 42: 1035–1040
- Lindholm T, Eriksson J E and Meriluoto J A O. 1989. Toxic cyanobacteria and water quality problems—example from a eutrophic lake on Åland, South West Finland. *Wat. Res.*, 23: 481–486
- Lippy E C and Erbb J. 1976. Gastrointestinal illness at Sewickley, PA. *J. Am. Water Works Assoc.*, 68: 606–610
- Liras V, Lindberg M, Nystrom P, Annadotter H, Lawton L A and Graf B. 1998. Can ingested cyanobacteria be harmful to the signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*)? *Freshwat. Biol.*, 39: 233–242
- MacKintosh C and MacKintosh R W. 1994. The inhibition of protein phosphatases by toxins: implications for health and an extremely sensitive and rapid bioassay for toxin detection. In: Codd G A, Jefferies T W, Keevil C W and Potter E, *Detection Methods for Cyanobacterial Toxins*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 90–99
- MacKintosh C, Beattie K A, Klumpp C, Cohen C and Codd G A. 1990. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatase 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Lett.*, 264: 187–192
- MacKintosh R W, Dalby K N, Campbell D G, Cohen P T W, Cohen P and MacKintosh C. 1995. The cyanobacterial toxin microcystin binds covalently to cysteine-273 on protein phosphatase 1. *FEBS Lett.*, 371: 236–240
- Magalhães V F, Marinho M M, Domingos P, Oliveira A C, Costa S M, Azevedo L O and Azevedo S M F O. 2003.

- Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil R J). *Toxicol*, 42: 289~295
- Magalhães V F, Soares R M and Azevedo S M F O. 2001. Microcystin contamination in fish from the Jacarepagua Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. *Toxicol*, 39: 1077~1085
- Malbrouck C, Trausch G, Devos P and Kestemont P. 2003. Hepatic accumulation and effects of microcystin-LR on juvenile goldfish *Carassius auratus* L. *Comp. Biochem. Physiol. C.*, 135: 39~48
- Malbrouck C, Trausch G, Devos P and Kestemont P. 2004a. Effect of microcystin-LR on protein phosphatase activity in fed and fasted juvenile goldfish *Carassius auratus* L. *Toxicol*, 43: 295~301
- Malbrouck C, Trausch G, Devos P and Kestemont P. 2004b. Effect of microcystin-LR on protein phosphatase activity and glycogen content in isolated hepatocytes of fed and fasted juvenile goldfish *Carassius auratus* L. *Toxicol*, 44: 927~932
- Marsden J E. 2005. *Dreissena polymorpha* (mollusc). In: ISSG Global Invasive Species Database (<http://www.issg.org/database>)
- Matsushima R, Yoshizawa S, Watanabe, M F, Harada K-I, Furusawa M, Carmichael W W and Fujiki H. 1990. *In vitro* and *in vivo* effects of protein phosphatase inhibitors, microcystins and nodularin, on mouse skin and fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 171: 867~874
- Mazur H and Pliński M. 2001. Stability of cyanotoxins, microcystin-LR, microcystin-RR and nodularin in seawater and BG-11 medium of different salinity. *Oceanologia*, 43: 329~339
- McElhiney J and Lawton L A. 2005. Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins. *Toxicol. Appl. Pharm.*, 203: 219~230
- McKim J M, Lien G J, Hoffman A D and Jenson C T. 1999. Respiratory- cardiovascular physiology and xenobiotic gill flux in lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 123A: 69~81
- Meissner K, Dittmann E and Börner T. 1996. Toxic and non-toxic strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* contain sequences homologous to peptide synthetase genes. *FEMS Microbiol. Lett.*, 135:295~303
- Meriluoto J A, Nygard S E, Dahlem A M and Eriksson J E. 1990. Synthesis, organotropism and hepatocellular uptake of two tritium-labeled epimers of dihydromicrocystin-LR, a cyanobacterial peptide toxin analog. *Toxicol*, 28: 1439~1445
- Metcalfe J S, Lindsay J, Beattie K A, Birmingham S, Saker M L, Torokne A K and Codd G A. 2002. Toxicity of *cylindrospermopsin* to the brine shrimp *Artemia salina*: comparisons with protein synthesis inhibitors and microcystins. *Toxicol*, 40: 1115~1120
- Metcalfe J D and Butler P J. 1982. Differences between directly measured and calculated values for cardiac output in the dogfish: a criticism of the fick method. *J. Exp. Biol.*, 99: 295~288
- Mille S C and Reynolds J D. 2003. The bitterling-mussel interaction as a test case for co-evolution. *J. Fish Biol., Suppl. A*: 84~104
- Miura G A, Robinson N A, Lawrence W B and Pace J G. 1991. Hepatotoxicity of microcystin-LR in fed and fasted rats. *Toxicol*, 29: 337~346
- Mohamed Z A and Hussein A A. 2006. Depuration of microcystins in tilapia fish exposed to natural populations of toxic cyanobacteria: a laboratory study. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 63: 424~429
- Mohamed Z A, Carmichael W W and Hussein A A. 2003. Estimation of microcystins in the freshwater fish *Oreochromis niloticus* in an Egyptian fish farm containing a *Microcystis* bloom. *Environ. Toxicol.*, 18: 137~141
- Moormo I M, Molina R, Jos A, Picó Y and Cameán A M. 2005. Determination of microcystins in fish by solvent extraction and liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 1080: 199~203
- Moorhead G, MacKintosh R W, Morrice N, Gallagher T and MacKintosh C. 1994. Purification of type 1 protein (serine/threonine) phosphatases by microcystin- Sepharose affinity chromatography. *FEBS Lett.*, 356: 46~50
- Nicholson B C and Burch M D. 2001. Evaluation of Analytical Methods for Detection and Quantification of Cyanotoxins in Relation to Australian Drinking Water Guidelines. NHMRC (<http://www.nhmrc.gov.au>)
- Nishiwaki R, Ohta T, Sueoka E, Suganuma M, Harada K, Watanabe M F and Fujiki H. 1994. Two significant aspects of microcystin-LR: specific binding and liver specificity. *Cancer Lett.*, 83: 283~289
- Nishiwaki-Matsushima R, Nishiwaki S, Ohta T, Yoshizawa S, Suganuma M, Harada K, Watanabe M F and Fujiki H.

1992. Structure-function relationships of microcystins, liver tumor promoters, in interaction with protein phosphatases. *Jpn. J. Cancer Res.*, 82: 993~996
- Oliver B G and Nimi A J. 1988. Trophodynamics analysis of polychlorinated biphenyl congeners and other chlorinated hydrocarbons in the Lake Ontario ecosystem. *Environ. Sci. Technol.*, 22: 388~397
- Opuszynski K and Shireman J V. 1995. *Herbivorous Fishes—Culture and Use for Weed Management*. CRC Press, Boca Raton Ann Arbor London Tokyo
- Ozawa K, Yokoyama A, Ishikawa K, Kumagai M, Watanabe M F and Park H D. 2003. Accumulation and depuration of microcystin produced by the cyanobacterium *Microcystis* in a freshwater snail. *Limnology*, 4: 131~138
- Pace J G, Robinson N A, Miura G A, Matson C F, Geisbert T W and White J D. 1991. Toxicity and kinetics of <sup>3</sup>H-microcystin-LR in isolated perfused rat livers. *Toxic. Appl. Pharmac.*, 107: 391~397
- Paerl HW, Fulton R S III, Moisander P H and Dyble J. 2001. Harmful freshwater algal blooms, with an emphasis on cyanobacteria. *Sci. World J.*, 1: 76~113
- Phillips M J, Roberts R J, Stewart J A and Codd G A. 1985. The toxicity of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to rainbow trout *Salmo gairdner* Richardson. *J. Fish. Dis.*, 8: 339~344
- Pilotto L S, Douglas R M, Burch M D, Cameron S, Beers M, Rouch G R, Robinson P, Kirk M, Cowie C T, Hardiman S, Moore C and Attewell R G. 1997. Health effects of recreational exposure to cyanobacteria (blue-green algae) during recreational water-related activities. *Aus. New Zealand J. Public Health*, 21: 562~566
- Pires L M D, Karlsson K M, Meriluoto J A O, Kardinaal E, Visser P M, Siewertsen K, Donk E V and Ibelings B W. 2004. Assimilation and depuration of microcystins-LR by the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Aquat. Toxicol.*, 69: 385~396
- Pouria S, Andrade A, Barbosa J, Cavalcanti R L, Barreto V T S, Ward C J, Preiser W and Poon G K. 1998. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *Lancet*, 352: 21~26
- Prepas E E, Kotak B G, Campbell L M, Evans J C, Hrudey S E and Holmes C F B. 1997. Accumulation and elimination of cyanobacterial hepatotoxins by the freshwater clam *Anodonta grandis simpsoniana*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 54: 41~46
- Prosser C L. 1973. Circulation of body fluids. In: *Comparative Animal Physiology* (edited by Prosser C L) W.B. Saunders, Philadelphia, Vol. 2: 822~856
- Purser J and Forreath N. 2003. 15 Salmonids. In: Lucas J S and Southgate P C. *Aquaculture - Farming Aquatic Animals and Plants*. 2951~3320. Fishing News Books, Blackwell Publishing Ltd, UK
- Quinn B, Gagn   F, Costello M, McKenzied C, Wilsone J and Mothersilla C. 2004. The endocrine disrupting effect of municipal effluent on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Aquat. Toxicol.*, 66: 279~292
- Råbergh, C M I, Bylund G. and Eriksson J E. 1991. Histopathological effects of microcystin-LR, a cyclic peptide toxin from the cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis aeruginosa* on common carp (*Cyprinus carpio* L.) *Aquat. Toxicol.*, 20: 131~146
- Rinehart K L, Namikoshi M and Choi B W. 1994. Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria). *J. Appl. Phycol.*, 6: 159~176
- Rivasseau C, Martins S and Hennion M C. 1998. Determination of some physicochemical parameters of microcystins (cyanobacterial toxins) and trace level analysis in environmental samples using liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 799: 155~169
- Robinson N A, Matson C F and Pace J G. 1991. Association of microcystin-LR and its biotransformation product with a hepatic-cytosolic protein. *J. Biochem. Toxicol.*, 6: 171~180
- Robinson N A, Matson C F, Miura G A, Lynch T G and Pace J G. 1990. Toxicokinetics of [<sup>3</sup>H]microcystin-LR in mice. *Fedn. Am. Soc. Expl. Biol.* 4, #2823, p. A753
- Robinson N A, Miura G A, Matson C F, Dinterman R E and Pace J G. 1989. Characterization of chemically tritiated microcystin-LR and its distribution in mice. *Toxicol.*, 27: 1035~1042
- Robinson N A, Pace J G, Matson C F, Miura G A and Lawrence W B. 1991. Tissue distribution, excretion and hepatic biotransformation of microcystin-LR in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 256: 176~182
- Romer A S and Parsons T S. 1977. *The Vertebrate Body*. Saunders Company, 5th edition(杨白仑译. 1985. 北京: 科学出

- Rudolph-Böhner S, Mierke D F and Moroder L. 1994. Molecular structure of the cyanobacterial tumor-promoting microcystins. *FEBS Lett*, 349: 319~323
- Ruiz M J, Cameá A M, Moreno I M and Picó. 2005. Determination of microcystins in biological samples by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr. A*, 1073: 257~262
- Runnegar M T C and Falconer I R. 1982. The *in vivo* and *in vitro* biological effects of the peptide hepatotoxin from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *S. Afr. J. Sci.*, 78: 363~366
- Runnegar M T C, Berndt N and Kaplowitz N. 1995. Microcystin uptake and inhibition of protein phosphatases: effects of chemoprotectants and self-inhibition in relation to known hepatic transporters. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 134: 264~272
- Runnegar M T C, Berndt N, Kong S M, Lee E Y C and Zhang L. 1995b. *In vivo* and *in vitro* binding of microcystin to protein phosphatase 1 and 2A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 216: 162~169
- Runnegar M T C, Falconer I R and Silver J. 1981. Deformation of isolated rat hepatocytes by a peptide hepatotoxin from the blue-green algae *Microcystis aeruginosa*. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 317: 268~273
- Runnegar M T C, Falconer I R, Buckley T and Jackson A R. 1986. Lethal potency and tissue distribution of <sup>125</sup>I-labelled toxic peptides from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Toxicol.*, 24: 506~509
- Runnegar M T, Gerdes R G and Falconer I R. 1991. The uptake of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by isolated rat hepatocytes. *Toxicol.*, 29: 43~51
- Sahin A, Tencalla F G, Dietrich D and Naegeli H P. 1996. Biliary excretion of biochemically active cyanobacteria (blue-green algae) hepatotoxins in fish. *Toxicology*, 106: 123~130
- Sano T, Nohara K, Shiraishi F and Kaya K. 1992. A method for micro-determination of total microcystin content in water-blooms of cyanobacteria (blue-green algae). *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 49: 163~170
- Satchell G H. 1999. Circulatory system: distinctive attributes of the circulation of elasmobranch fish. In: *Sharks, Skates, and Rays. The Biology of Elasmobranch Fishes.* (edited by Hamlett W C). Baltimore, Johns Hopkins Press
- Schwarzenbach R P, Gschwend P M and Imboden D M. 2003. *Environmental Organic Chemistry* (2<sup>nd</sup> ed.). John Wiley & Sons, Inc.
- Sewald N and Jakubke H D. 2002. *Peptides: Chemistry and Biology*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Federal Republic of Germany
- Shenolikar S. 1994. Protein serine/threonine phosphatases - new avenues for cell regulation. *A. Rev. Cell Biol.*, 10: 55~86
- Sipiä V O, Kankaanpää H T, Lahti K, Carmichael W W and Meriluoto J A O. 2001. Detection of nodularin in flounders and cod from the Baltic Sea. *Environm. Toxicol.*, 16: 121~126
- Sivonen K and Jones G. 1999. Cyanobacterial toxins. In: *Chorus I and Bartram J. Toxic Cyanobacteria in Water, A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management.* E & FN Spon, London and New York. 41~111
- Skulberg O M, Carmichael W W, Codd G A and Skulberg R. 1993. Taxonomy of toxic cyanophyceae (Cyanobacteria). In: *Falconer I R. Algal Toxins in Seafood and Drinking Water.* Academic Press, London, 145~164
- Smith D G. 2001. *Pennak's Freshwater Invertebrates of the United States, Porifera to Crustacea.* 4<sup>th</sup> edition. John Wiley & Sons, Inc.
- Snyder G S, Goodwin A E and Freeman D W. 2002. Evidence that channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), mortality is not linked to ingestion of the hepatotoxin microcystin-LR. *J. Fish Diseases.*, 25: 275~285
- Soares R M, Magalhães V F and Azevedo S M F O. 2004. Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (Cichlidae) under laboratory conditions. *Aquat. Toxicol.*, 70: 1~10
- Stevens E D and Randall D J. 1967. Changes in blood pressure, heart rate and breathing rate during moderate swimming activity in rainbow trout. *J. Exp. Biol.*, 46: 307~315
- Stevens E D. 1972. Some aspects of gas exchange in tuna. *J. Exp. Biol.*, 56: 809~823
- Stewart K K and Ebel R E. 2000. *Chemical Measurements in Biological Systems.* John Wiley & Sons, Inc.
- Stinner J N and Ely D L. 1993. Blood pressure during routine activity, stress, and feeding in black racer snakes (*Caluber constrictor*). *Am. J. Physiol.*, 264: R79~R84

- Suresh 2003. 16 Tilapias. In: Lucas J S and Southgate P C. Aquaculture - Farming Aquatic Animals and Plants. 321~345. Fishing News Books, Blackwell Publishing Ltd, UK
- Svrcek C and Smith D W. 2004. Cyanobacteria toxins and the current state of knowledge on water treatment options: a review. *J. Environ. Eng. Sci.*, 3: 155~185
- Sykora J L and Keleti G. 1981. Cyanobacteria and endotoxins in drinking water supplies. In: Carmichael W W. The Water Environment. Algal Toxins and Health. Plenum Press, New York, 285~302
- Takai A, Sasaki K, Nagai H, Mieskes G, Isobe M, Isono K and Yasumoto T. 1995. Inhibition of specific binding of okadaic acid to protein phosphatase 2A by microcystin-LR, calyculin-A and tautomycin: method of analysis of interactions of tight-binding ligands with target proteins. *Biochem. J.*, 306: 657~682
- Teixeira M G L C, Costa M C N, Carvalho V L P, Pereira M S and Hage E. 1993. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil. *Bulletin PAHO*, 27: 244~253
- Tencalla F and Dietrich D. 1997. Biochemical characterization of microcystin toxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicon*, 35: 583~595
- Tencalla F, Dietrich D and Schlatter C. 1994. Toxicity of *Microcystis aeruginosa* peptide toxin to yearling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.*, 30: 215~224
- Tharp R. 2003. Review of Pharmacokinetic Concepts. [www.rxkinetics.com](http://www.rxkinetics.com).
- Tisdale E. 1931. Epidemic of intestinal disorders in Charleston, W. Va., occurring simultaneously with unprecedented water supply conditions. *Am. J. Public Health*, 21: 198~200
- Tsuji K, Naito S, Kondo F, Ishikawa N, Watanabe M F, Suzuki M and Harada K I. 1994. Stability of microcystins from cyanobacteria: effect of light on decomposition and isomerization. *Environ. Sci. Tech.*, 28: 173~177
- Tsuji K, Watanuki T, Kondo F, Watanabe M F, Suzuki S, Nakazawa H, Suzuki M, Uchida H and Harada K. 1995. Stability of microcystins from cyanobacteria-II. Effect of UV light on decomposition and isomerization. *Toxicon*, 33: 1619~1631
- Turner P C, Gammie A J, Hollinrake K and Codd G A. 1990. Pneumonia associated with cyanobacteria. *Br. Med. J.*, 300: 1440~1441
- Ueno Y, Nagata S, Tsutsumi T, Hasegawa A, Watanabe M, Park H D, Chen G C, Chen G and Yu S Z. 1996. Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic area of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis*, 17: 1317~1321
- Vasconcelos V M. 1999. Cyanobacterial toxins in Portugal: effects on aquatic animals and risk for human health. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 32: 249~254
- Vasconcelos V M, Oliveira S and Teles F O. 2001. Impact of a toxic and a non-toxic strain of *Microcystis aeruginosa* on the crayfish *Procambarus clarkii*. *Toxicon*, 39: 1461~1470
- Vasconcelos V M, Sivonen K, Evans W R, Carmichael W W and Namikoshi M. 1996. Microcystin (heptapeptide hepatotoxins) diversity in cyanobacterial blooms collected in Portuguese fresh waters. *Wat. Res.*, 30: 2377~2384
- Vasconcelos V M. 1995. Uptake and depuration of the heptapeptide toxin microcystin-LR in *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.*, 32: 227~237
- Veith G D, Macek K J, Petrocelli S R and Carroll J. 1980. An Evaluation of using partition coefficient and water solubility to estimate bioaccumulation factors for organic chemicals in fish. In: Aquatic Toxicology, Eaton J G et al. American Society for Testing Materials, Philadelphia, PA. ASTM 707
- Vera L D and Gonzalez J. 1997. Power spectral analysis of short-term RR interval and arterial blood pressure oscillations in lizard (*Gallotia galloti*): effects of parasympathetic blockade. *Comp. Biochem. Physiol.*, 118A: 671~678
- Wannemacher R W. 1989. Chemical Stability and Laboratory Safety of Naturally Occurring Toxins. US Army Medical Research, Institute of Infectious Disease. Fort Detrick, Frederick, MD, 9~11
- Ward C J and Codd G A. 1999. Comparative toxicity of four microcystins of different hydrophobicities to the protozoan, *Tetrahymena pyriformis*. *J. Appl. Microbiol.*, 86: 874~882
- Warne J M and Balment R J. 1997. Changes in plasma arginine vasotocin (AVT) concentration and dorsal aortic blood pressure following AVT injection in the teleost *Platichthys flesus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 105: 358~364

- Watanabe M F, Oishi S, Harada K, Matsuura K, Kawai H and Suzuki M. 1988. Toxins contained in *Microcystis* species of cyanobacteria (blue-green algae). *Toxicon*, 26: 1017~1025
- Watanabe M F, Park H D, Kondo F, Harada K, Hayashi H and Okino T. 1997. Identification and estimation of microcystins in freshwater mussels. *Nat. Toxins*, 5:31~35
- Welcomme R L. 1988. International introductions of inland aquatic species. FAO Fish. Tech. Pap. No. 294. 318 p
- WHO. 1997. Report of the Working Group Meeting on Chemical Substances in Drinking-Water. World Health Organization: Geneva
- WHO. 1998. Guidelines for Drinking-water Quality, Second edition, Volume 2, Health Criteria and Other Supporting Information. World Health Organization, Geneva
- Williams D E, Craig M, Dawe S C, Kent M L, Andersen R J and Holmes C F B. 1997a. <sup>14</sup>C-labeled microcystin-LR administered to Atlantic salmon via intraperitoneal injection provides *in vivo* evidence for covalent binding of microcystin-LR in salmon livers. *Toxicon*, 35: 985~989
- Williams D E, Craig M, Dawe S C, Kent M L, Holmes C F B and Andersen R J. 1997b. Evidence for a covalently bound form of microcystin-LR in salmon liver and Dungeness crab larvae. *Chem. Res. Toxicol.*, 10: 463~469
- Williams D E, Dawe S C, Kent M L, Andersen R J, Craig M and Holmes C F B. 1997c. Bioaccumulation and clearance of microcystins from salt water mussels, *Mytilus edulis*, and *in vivo* evidence for covalently bound microcystins in mussel tissues. *Toxicon*, 35: 1617~1625
- Williams D E, Kent M L, Andersen R J, Klix H and Holmes C F B. 1995. Tissue distribution and clearance of tritium-labeled dihydromicrocystin-LR epimers administered to Atlantic salmon via intraperitoneal injection. *Toxicon*, 33: 125~131
- Williams E H, Bunkley-Williams L, Lilyestrom C G and Ortiz-Corps E A R. 2001. A review of recent introductions of aquatic invertebrates in Puerto Rico and implications for the management of nonindigenous species. *Carbb. J. Sci.*, 37: 246~251
- Xie L Q and Park H D. 2007. Determination of microcystins in fish tissues using HPLC with a rapid and efficient solid phase extraction. *Environ. Toxicol.* (in press)
- Xie L Q, Xie P, Ozawa K, Honma T, Yokoyama A and Park H D. 2004. Dynamics of -LR and microcystins -RR in the planktivorous silver carp in a sub-chronic toxic experiment. *Environ. Pollut.*, 127: 431~439
- Xie LQ, Xie P, Guo L G, Li L, Miyabara Y and Park H D. 2005. Organ distribution and bioaccumulation of microcystins in freshwater fish at different trophic levels from the eutrophic Lake Chaohu, China. *Environ. Toxicol.*, 20: 293~300
- Xie P and Liu J K. 2001. 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. *Sci. World J.*, 1:337~356
- Xie P. 1999. Gut contents of silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix*, and the disruption of a centric diatom, *Cyclotella*, on passage through the esophagus and intestine. *Aquaculture*, 180: 295~305
- Xie P. 2001. Gut contents of bighead carp (*Aristichthys nobilis*) and the process and digestion of algal cells in the alimentary canal. *Aquaculture*, 195: 149~161
- Yokoyama A and Park H D. 2002. Mechanism and prediction for contamination of freshwater bivalves (Unionidae) with the cyanobacterial toxin microcystin in hypereutrophic Lake Suwa, Japan *Environ. Toxicol.* 17: 424~433
- Yokoyama A and Park H D. 2003. Depuration kinetics and persistence of the cyanobacterial toxin microcystin-LR in the freshwater bivalve *Unio douglasiae*. *Environ. Toxicol.*, 18: 61~67
- Yoshida T, Makita Y, Nagata S, Tsutsumi T, Yoshida F, Sekijima M, Tamura S I and Ueno Y. 1997. Acute oral toxicity of microcystin-LR, a cyanobacterial hepatotoxin, in mice. *Nat. Toxins*, 5: 91~95
- Yoshizawa S, Matsushima R, Watanabe M F, Harada K-I, Ichihara A, Carmichael W W and Fujiki H. 1990. Inhibition of protein phosphatases by microcystins and nodularin associated with hepatotoxicity. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 116: 609~614
- Yu S J. 1995. Primary prevention of hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 10: 674~682
- Yu S Z. 1989. Drinking water and primary liver cancer. In: Tang Z Y, Wu M C and Xia S S. Primary Liver Cancer. China Academic Publishers, New York, 30~37

- Zhang Q X, Carmichael W W, Yu M J and Li S H. 1991. Cyclic peptide hepatotoxins from freshwater cyanobacterial (blue-green algae) waterblooms collected in central China. *Env. Toxicol. Chem.*, 10: 313~321
- Zhao M, Xie S, Zhu X, Yang Y X, Gan L Q and Song L R. 2006. Effect of inclusion of blue-green algae meal on growth and accumulation of microcystins in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). *J. App. Ichth.*, 22: 72~78
- Zilberg B. 1966. Gastroenterities in Salisbury. European children—a five-year study. *Cent. Afr. J. Med.*, 12: 164~168
- Zurawell R W, Kotak B G and Prepas E. 1999. Influence of lake trophic status on the occurrence of microcystin-LR in the tissue of pulmonate snails. *Freshwat. Biol.*, 42: 707~718

## 作者简介



谢平(e-mail: xieping@ihb.ac.cn), 湖北洪湖人, 中国科学院水生生物研究所研究员, 华中农业大学水产学院讲座教授。1989 年于日本筑波大学生物系获理学博士学位, 1998 年入选中国科学院“百人计划”, 现任中国科学院生态系统研究网络东湖湖泊生态系统试验站(国家重点野外台站)站长, 淡水生态与生物技术国家重点实验室副主任, 中国科学院水生生物研究所淡水生态学研究中心主任, 现主要从事淡水生态学和生态毒理学方面的研究。1999 年获第 9 届日本琵琶湖生态学奖, 2001 年, 获得中国科学院青年科学家奖(创新奖)并被评为优秀“百人计划”获得者, 2003 年获国家杰出青年基金资助。在国内外学术杂志上发表研究论文 140 多篇, 其中 SCI 源刊论文 90 余篇。现担任 *Ecological Research* (SCI 源刊)、*Limnology* (SCI 源刊)、*Freshwater System* 杂志(A domain of the Scientific World Journal) (SCI 源刊)的编委及《湖泊科学》副主编。