

# 微囊藻毒素对多种靶器官的毒性作用研究进展

叶冠琛<sup>1</sup> 王一如<sup>1</sup> 徐立红<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>浙江大学医学院口腔系, 杭州 310058; <sup>2</sup>浙江大学医学院生物化学系, 杭州 310058)

**摘要** 微囊藻毒素是一类主要由微囊藻产生的单环七肽毒素。近年来, 大量文献与研究表明, 微囊藻毒素具有胚胎发育和生殖毒性, 可以导致胚胎死亡、畸形或发育迟缓, 影响生殖激素水平, 对生殖系统产生负面效应。此外, 微囊藻毒素还对神经系统、免疫系统产生影响包括诱导细胞凋亡、氧化应激以及引起线粒体功能改变等。该文总结了上述相关内容的最新研究进展, 并展望了未来的研究方向。

**关键词** 微囊藻毒素; 胚胎发育毒性; 生殖毒性; 神经毒性; 免疫损伤; 细胞凋亡

## Research Progress on the Toxicity of Microcystins to Multiple Target Organs

Ye Guanchen<sup>1</sup>, Wang Yiru<sup>1</sup>, Xu Lihong<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Dentistry, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; <sup>2</sup>Department of Biochemistry, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

**Abstract** Microcystin is a kind of monocyclic heptapeptide toxin produced mainly by microcystis. In recent years, studies have shown that microcystin has embryotoxicity and reproductive toxicity, which can lead to embryo death, deformity or retardation, affecting the level of reproductive hormones and having negative effects on the reproductive system. In addition, microcystin also jeopardise the nervous system and immune system by the mechanisms of inducing apoptosis, oxidative stress and mitochondrial dysfunctions. This paper summarizes the latest research progress mentioned above and looks forward to the future research direction.

**Keywords** microcystin; embryonic developmental toxicity; reproductive toxicity; neurotoxicity; immune injury; cell apoptosis

微囊藻毒素(microcystins, MCs)是一组单环七肽物质, 其中有两种可变氨基酸, 到目前为止, 根据甲基化、羟基化、表异构化程度以及可变氨基酸的不同, 已经发现了80种不同的微囊藻毒素的亚型。以可变氨基酸为亮氨酸(L)和精氨酸(R)的微囊藻毒素LR(microcystin-LR, MCLR)为最常见、毒性最强而且被广泛研究, 两个可变氨基酸均为精氨酸(R)的微囊藻毒素RR(microcystin-RR, MCRR)毒

性次之, 存在也很广泛。由于其肝脏、肾脏等器官毒性以及强促癌性, 微囊藻毒素已被认为是严重威胁野生动植物以及人类健康的环境污染物, 并得到广泛关注, 其多种特性已被揭示, 对这些特性的认识使得人们对于微囊藻毒素的特点及其危害有了更加深入的了解。

微囊藻毒素毒性作用的靶器官主要是肝和肾。同位素示踪显示, 静脉注射、腹腔注射和口服3种不

收稿日期: 2018-10-15 接收日期: 2019-02-19

国家自然科学基金(批准号: 81172703)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0571-88208265, E-mail: xulihong@zju.edu.cn

Received: October 15, 2018 Accepted: February 19, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81172703)

\*Corresponding author. Tel: +86-571-88208265, E-mail: xulihong@zju.edu.cn

网络出版时间: 2019-07-16 16:02:12 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190716.1602.006.html>

同途径进入小鼠体内的<sup>125</sup>I-MCLR, 70%以上分布在肝脏和肾脏<sup>[1]</sup>。但近年来, 对微囊藻毒素在其它靶器官中的毒理效应与机理逐渐成为新的热点, 本实验室研究也发现了微囊藻毒素对神经内分泌PC12细胞株、肾来源的HEK293及小鼠肾脏作用的分子机制<sup>[2-4]</sup>, 因此应当从全新的角度和整体的全局观来认识微囊藻毒素的作用机制。本文在综合介绍了近年来对微囊藻毒素毒性的最新研究成果、新的研究方法与设计思路的同时, 进一步探讨了此领域下一步的研究方向。

## 1 微囊藻毒素的肝肾毒性新进展

### 1.1 微囊藻毒素导致肝脏脂质代谢紊乱

小鼠慢性低剂量接触MCLR, 每2天腹腔注射200 μg/kg MCLR共90天后, 肝脏和血清中脂质代谢产物出现显著波动, 脂肪酸β-氧化和肝脏脂蛋白分泌被抑制, 促进了肝脏炎症, 导致了非酒精性脂肪肝的产生<sup>[5]</sup>。

在各种脂质代谢途径中, 胆固醇的合成受到显著影响, 其代谢途径中被干扰的代谢物数量最多。类固醇激素和胆汁酸这类公认的内分泌信号分子合成受到干扰, 表明微囊藻毒素即使在亚致死条件下也能引起水生生物内分泌紊乱。除了胆固醇合成外, 在斑马鱼暴露于MCLR/MCRR后, 还观察到属于必需脂肪酸类和脂质氧化的各种其他代谢途径受到干扰<sup>[6]</sup>。

### 1.2 微囊藻毒素干扰肝脏代谢功能

细胞色素P450s(CYPs)在动物内源性物质和环境污染物的生物转化中起着重要作用, 小鼠低剂量MCLR暴露, 腹腔注射2、4、8 μg/kg·d MCLR 7天后, 小鼠肝脏中CYP1A1和CYP3A11活性降低, CYP2E1活性显著上升<sup>[7]</sup>。

MCLR暴露对CYP1A1和CYP3A11活性的抑制表明, 这些酶可能不参与小鼠肝脏中MCLR的代谢, CYP2E1活性的增加说明CYP2E1参与了MCLR的代谢。

CYP2E1是CYP超家族的关键成员, 在代谢低分子疏水化学物质中发挥重要作用。此外, 它还能将分子氧转化为高活性化合物, 包括超氧阴离子自由基、过氧化氢、羟基自由基等, 可能导致DNA损伤和致癌<sup>[8]</sup>。MCLR显著提高了小鼠肝脏CYP2E1的mRNA水平、蛋白含量和活性, 可能会增加小鼠肝脏中活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)的生成,

导致肝脏的损伤。

### 1.3 微囊藻毒素促进肝肾肿瘤的形成

微囊藻毒素慢性肝毒性的另一重要影响, 表现在其与肿瘤发生的关系, 除了早期研究发现的其强促癌活性以及与人群原发性肝癌的相关性之外, 研究发现, 对老鼠长时间注入亚致死量的微囊藻毒素可使老鼠肝脏产生新生瘤, 证明其同样具有诱导肝肿瘤形成的作用<sup>[9]</sup>。

通过BrdU掺入实验, 发现1~10 nmol/L浓度范围内的MCLR暴露刺激肾源性Vero-E6细胞系的增殖。通过对丝裂原激活的蛋白激酶p38、JNK和ERK1/2活性的分析发现, 较低浓度的MCLR不影响p38和JNK MAPK通路, 但激活ERK1/2通路, 说明MCLR在肾脏水平上也有促进肿瘤生成的作用<sup>[10]</sup>。

## 2 微囊藻毒素的胚胎发育毒性

研究发现, 性腺可能成为重要的靶器官, 微囊藻毒素具有胚胎生殖毒性, 可在受精卵中分布并传递给后代, 导致胚胎死亡、畸形或发育迟缓。胚胎发育时期的受损多不可逆, 影响到各个阶段的生长发育。近年来, 随着研究的深入, 不断揭示出微囊藻毒素对不同器官胚胎发育的影响。

### 2.1 PP2A抑制导致胚胎肝脏糖原含量下降及细胞骨架破坏

Jacquet等<sup>[11]</sup>研究发现, 与微囊藻毒素的肝毒性作用一致, 注射100 μg/L MCLR后的斑马鱼单细胞阶段胚胎, 在晚期发育阶段或在孵化后表现出明显的肝胆损伤、肝出血和坏死。孵化后的斑马鱼肝脏的质量、大小显著下降<sup>[12]</sup>。

除了形态学上的改变, 肝的功能也受到了严重损害。肝脏的功能包括维持正常的血糖浓度, 以肝糖原的形式储存葡萄糖, 并通过糖原分解产生葡萄糖。在孵化之前, 由于早期葡萄糖的产生, 在胚胎鱼肝细胞中就存在大量的糖原储存。但在胚胎期间注射MCLR后, 肝脏中的糖原储存被耗尽<sup>[5]</sup>。微囊藻毒素是通过抑制蛋白磷酸酶2A(protein phosphatase 2A, PP2A)的活性, 从而抑制肝脏内糖原合成酶的活性和激活糖原磷酸化酶的活性, 导致碳水化合物代谢紊乱、肝糖原含量下降<sup>[13]</sup>。

Zhao等<sup>[14]</sup>发现, 围产期大鼠腹腔注射10 μg/kg·d MCLR 4周后, MCLR可以在新生大鼠的肝脏中积累, 出现肝细胞间的间隙增大和胞质真空化。细胞

间空隙的增大被认为与细胞骨架的破坏有关, 具体表现为微管、细胞角蛋白中间丝和微丝的断裂。微囊藻毒素对细胞骨架造成破坏的主要原因是抑制了PP2A的活性, 而PP2A在维持细胞骨架完整、保持细胞形态方面具有重要作用, 许多细胞骨架相关蛋白的功能都受到PP2A可逆磷酸化的调节。

微囊藻毒素在胚胎发育中的肝毒性是由氧化应激和线粒体功能紊乱引起的。微囊藻毒素暴露后, 新生小鼠肝脏中ROS显著增加, 谷胱甘肽(glutathione, GSH)显著下降。GSH作为细胞内重要的抗氧化剂以及其他抗氧化酶作用的底物, 它在细胞内含量的减少会造成细胞内抗氧化系统功能下降。当抗氧化系统已经无法及时去除微囊藻毒素诱导产生的ROS时, 就造成了细胞内氧化应激状态, 造成DNA的损伤, 线粒体的结构与功能的破坏, 最终导致肝脏氧化损伤<sup>[7]</sup>。

## 2.2 细胞凋亡增加影响胚胎心脏的发育

Liu等<sup>[15]</sup>研究了泥鳅胚胎发育期接触微囊藻毒素后出现的畸形现象, 发现100  $\mu\text{g/L}$ 的MCLR暴露下, 30%的泥鳅胚胎出现心脏的异常变化, 包括心包水肿、管状心脏和心动过缓。Saraf等<sup>[16]</sup>发现, 青鳉受到微囊藻属藻类引起的淡水藻有害藻华的影响, 出现剂量相关性的心率降低、心动过缓现象, 且比实验室相同浓度下的微囊藻毒素暴露更为严重, 藻华中微囊藻毒素浓度低至250  $\mu\text{g/L}$ 就可导致所有胚胎的快速死亡(24小时内)。

微囊藻毒素可导致斑马鱼胚胎内ROS含量上升, 细胞呈氧化应激状态, 而心肌富含线粒体, 在线粒体和质膜中富含多不饱和脂肪酸, 因此心肌很容易受到微囊藻毒素毒性作用所产生的自由基的攻击<sup>[17]</sup>。丙二醛(malondialdehyde, MDA)的形成是脂质过氧化水平和氧化应激发展的指标, 是氧自由基作用于脂质的不饱和脂肪酸后产生的。在低剂量围产期MCLR暴露后, 新生大鼠中MDA含量上升, 这可能是心肌受损所导致的<sup>[8]</sup>。

微囊藻毒素通过诱导ROS累积, 进一步引发了斑马鱼胚胎心脏的凋亡。p53-Bax-Bcl2通路 and caspase依赖型凋亡途径扮演着微囊藻毒素诱导凋亡的主要角色<sup>[18]</sup>。一般来说, p53通过上调促凋亡基因的转录和下调抗凋亡基因(包括Bcl-2家族的基因)的转录来诱导细胞凋亡。Bcl-2抑制凋亡; Bax具有促进凋亡作用。在决定细胞凋亡的过程中, Bax/Bcl-2的比例至关重要。暴露于微囊藻毒素之后, 斑马鱼

胚胎出现p53的转录水平和蛋白质表达的显著上调, Bax的上调和Bcl-2的下调, 显著促进凋亡。Zeng等<sup>[12]</sup>在斑马鱼幼体的心脏中发现了较高比例的凋亡细胞存在, 可以推测, 发育的心脏是微囊藻毒素的重要靶标, 微囊藻毒素诱导的心肌细胞的凋亡导致心率下降, 循环衰竭, 影响了斑马鱼的早期发育。

## 2.3 甲状腺轴基因表达异常干扰胚胎内分泌系统

甲状腺激素, 包括甲状腺素(tetraiodothyronine, T4)和三碘甲腺原氨酸(triiodothyronine, T3), 影响胚胎的正常生长和发育。甲状腺激素直接调控胚胎的新陈代谢和氧气消耗, 并且还间接地通过调控其他激素和生长因子来间接影响胎儿发育, 如儿茶酚胺和胰岛素样生长因子。胚胎时期的甲状腺激素通过调节组织的增生和分化, 确保了在出生后生存所必需的生理过程的激活, 如肺气体交换、肝糖生成和心脏的适应<sup>[19]</sup>。

Cheng等<sup>[20]</sup>发现, 在长期暴露条件下, 微囊藻毒素对甲状腺内分泌系统有跨代毒性, 微囊藻毒素会扰乱亲代的甲状腺内分泌系统, 而这种干扰效应可以显著地传递给它的F1后代。成年斑马鱼(F0)暴露于1、5、25  $\mu\text{g/L}$  MCLR的环境下45天后, 雌性斑马鱼的T4下降, T3水平不变, 而雄性的T4和T3水平没有变化。产生的F1子代中, 甲状腺激素水平下降, 伴随着孵化率下降和发育迟缓。

微囊藻毒素通过调节下丘脑-垂体-甲状腺轴重要基因的表达来干扰甲状腺激素的分泌, 继而干扰胚胎的生长发育。Yan等<sup>[21]</sup>将受精后的斑马鱼胚胎暴露于500  $\mu\text{g/L}$ 的MCLR后, 发现斑马鱼生长受到抑制, 体长显著降低, 甲状腺激素的生物合成受到干扰, 同时下丘脑-垂体-甲状腺轴相关基因的表达模式也发生了显著变化, 促肾上腺皮质激素释放因子、促甲状腺激素、碘化酶和甲状腺球蛋白的基因表达水平明显改变。

## 3 微囊藻毒素的生殖毒性

已有实验证明, 微囊藻毒素可以在各种生物的性腺中积累并对生殖系统产生负面影响。此外, 微囊藻毒素还可在受精卵中大量存在而传递到后代, 体现了微囊藻毒素的跨代效应。因此, 近年来, 微囊藻毒素的生殖毒性受到了广泛关注和重视。

### 3.1 微囊藻毒素导致睾丸受损及精子生成障碍

Li等<sup>[22]</sup>发现, 雄性大鼠慢性低剂量接触微囊藻

毒素,口服15  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$  MCLR 28天后,睾丸间质细胞、睾丸支持细胞和成熟精子的数量减少,睾丸出现萎缩,曲细精管之间空隙增大,曲细精管的腔体扩大并且有堵塞现象。此外,微囊藻毒素破坏了睾丸支持细胞的紧密连接进而破坏了血睾屏障<sup>[23]</sup>。睾丸细胞的细胞器出现超微结构变化,线粒体、内质网和高尔基体出现了扩张,线粒体的形态、基质的染色情况和嵴的数目出现改变。与此同时,抗氧化酶如过氧化氢酶活性增强,谷胱甘肽含量增加,而超氧化物歧化酶活性显著降低。这些结果表明,睾丸的防御系统会迅速应对微囊藻毒素带来的氧化应激。

除了哺乳动物,还有研究发现,16  $\mu\text{g}/\text{L}$  MCLR暴露可显著增加线虫有过短伪足的异常精子,使活性精子的百分比下降<sup>[24]</sup>;100  $\text{nmol}/\text{L}$  MCLR暴露使金线蛙的精子细胞数量减少,精子活性降低,精子畸形率显著增加<sup>[25]</sup>。

### 3.2 微囊藻毒素导致卵巢受损及卵子生成障碍

微囊藻毒素可降低睾酮含量,破坏相关的下丘脑-垂体-性腺轴基因的转录,干扰生殖内分泌系统,损害雌性鱼类繁殖和发育能力<sup>[26]</sup>,还可导致雌性小鼠性腺激素水平和发情周期反常,生育能力下降<sup>[27]</sup>。

暴露在30  $\mu\text{g}/\text{L}$  MCLR中直至性成熟的雌性斑马鱼出现了生长抑制、卵巢重量减少和卵巢异常病变。大脑FSH $\beta$ 、LH $\beta$ 和卵巢ER、FSHR、LHR的转录显著上调,这种在下丘脑-垂体-性腺轴上的反馈调节,是微囊藻毒素损伤后的补偿机制<sup>[28]</sup>。

微囊藻毒素可以干扰卵子生成,体外研究表明,颗粒细胞会吸收MCLR,成为毒物的靶标。由微囊藻毒素引起的颗粒细胞的氧化应激状态导致了卵泡的闭锁,性腺指数的减少<sup>[21]</sup>。

### 3.3 微囊藻毒素引起睾酮与雌二醇水平紊乱

睾酮由睾丸间质细胞合成与分泌,受到垂体前叶分泌的黄体生成素的作用,可促进精子的发生和生殖器官发育。口服15  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$  MCLR 28天后,雄性大鼠血清睾酮水平下降,导致了精子形成的损伤<sup>[16]</sup>。Wang等<sup>[29]</sup>在体内试验中发现,MCLR不能进入睾丸间质细胞,对睾丸间质细胞没有细胞毒性,研究显示,MCLR直接作用于下丘脑的分泌细胞,使下丘脑第三脑室周围的细胞凋亡,通过破坏低丘脑-垂体系统,进而影响雄性小鼠血清激素的水平<sup>[30]</sup>。

CYP19A1、CYP17A1、HSD3B2和HSD17B3对于脊椎动物性腺的睾酮合成至关重要。CYP11A1

催化了线粒体中胆固醇的转化,这是类固醇生成的第一步;CYP17A1催化孕烯酮产生17 $\alpha$ -羟孕酮,并随后转化为脱氢表雄酮(DHEA);HSD3B2负责将DHEA转换为性腺的雄烯二酮,而HSD17B3主要在睾丸中产生,它可以催化雄烯二酮转化为睾酮<sup>[31]</sup>。目前的研究发现,30  $\mu\text{g}/\text{L}$  MCLR暴露条件下,雄性斑马鱼CYP11A1、CYP17A1和HSD3B2的mRNA表达水平降低,而HSD17B3的mRNA表达水平14天之后显著下降,从而阻碍了睾酮的生成<sup>[32]</sup>。

低浓度的MCLR暴露不仅显著降低了睾酮浓度,还增加了雌二醇浓度,诱发了非剂量依赖性的雌激素效应,导致了内分泌紊乱<sup>[33]</sup>。CYP19A1调节睾酮转化为雌二醇,在内分泌系统中扮演着重要的角色。Hou等<sup>[26]</sup>发现,低浓度的MCLR可以导致雄性和雌性斑马鱼体内CYP19A1的mRNA表达大量上调,导致了睾酮和雌二醇的不平衡。

## 4 微囊藻毒素的神经毒性

早先已发现,微囊藻毒素可在水生和陆生动物的大脑中积累,对中枢及外周神经产生毒理作用,出现不同程度的病理改变,使得空间、学习、记忆能力出现障碍。近年来,通过蛋白质组学、组织病理学检测、动物行为学观察等实验手段,逐渐揭示了微囊藻毒素神经毒性产生的机理。

### 4.1 微囊藻毒素通过有机阴离子转运多肽入脑

人们普遍认为大分子物质不能通过血脑屏障进入中枢神经系统,但微囊藻毒素存在特殊的转运机制,能通过有机阴离子多肽(organic anion transporting polypeptide, OATP)进入中枢神经系统,这种转运机制使得微囊藻毒素穿经血脑屏障成为可能,进而诱发神经毒性<sup>[34]</sup>。OATP是一种膜转运蛋白,含OATP较多的组织或器官的细胞能吸收更多的微囊藻毒素,产生的毒性效应也更为严重。

大脑的星形胶质细胞表达OATP,10 000  $\text{nmol}/\text{L}$  MCLF和MCLW处理24小时后,MTT法检测到细胞生存能力下降,胶原原纤酸蛋白、肌动蛋白和微管蛋白网络发生降解,细胞萎缩,功能丧失<sup>[35]</sup>。

### 4.2 微囊藻毒素破坏神经细胞的细胞骨架

微囊藻毒素在细胞水平上的毒性表现为细胞起泡、细胞破裂、膜完整性丧失和形成凋亡小体,这些都是细胞骨架解体的结果。微管系统是神经细胞骨架成分,可参与多种细胞功能。微管由微管蛋

白及微管相关蛋白组成, Tau蛋白是含量最高的微管相关蛋白。正常脑中Tau蛋白的细胞功能是与微管蛋白结合促进其聚合形成微管; 与形成的微管结合, 维持微管稳定性, 降低微管蛋白分子的解离, 并诱导微管成束。本实验室<sup>[4]</sup>对神经内分泌PC12细胞系的研究表明, MCLR会导致Tau蛋白的过度磷酸化, 这可能是由于PP2A受到抑制和随后的MAPK信号通路的激活导致的。Ding等<sup>[36]</sup>在大鼠原代小脑颗粒神经元中的研究也表明, MCLR暴露诱导Tau蛋白过度磷酸化和Caspase依赖的细胞凋亡。阿尔茨海默症(老年痴呆症)患者脑的Tau蛋白呈异常过度磷酸化, 每分子Tau蛋白可含5~9个磷酸基, 并丧失正常生物功能, 因此, 微囊藻毒素可能对阿尔兹海默病的发生有潜在影响。

### 4.3 微囊藻毒素触发CaN信号诱导凋亡

钙调神经磷酸酶(calcineurin, CaN)信号在诱导神经元信号的过程中起到重要作用<sup>[37]</sup>。Cai等<sup>[38]</sup>的实验提出了MCLR触发的细胞内游离钙浓度( $[Ca^{2+}]$ )激活诱导神经元死亡的假说, 实验结果证明, 使用原代海马神经元, MCLR通过从细胞内储存释放 $Ca^{2+}$ 破坏神经元中的 $[Ca^{2+}]$ 稳态, 并且这种 $[Ca^{2+}]$ 的增加可能是MCLR诱导的神经毒性机制的关键决定因素。Li等<sup>[39]</sup>使用蛋白质组学分析, 发现给大鼠注射10  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$  MCLR 50天后, 大鼠海马神经元中, CaN被激活, 继而激活T细胞亚型c3(NFATc3)。CaN信号的活化通过促凋亡Bcl-2家族成员Bad的去磷酸化导致细胞凋亡。与此相一致, 用CaN抑制剂FK506处理神经元可以阻断由MCLR导致的去磷酸化和细胞色素c的释放减少。

### 4.4 微囊藻毒素扰乱神经递质系统

在中枢神经系统中, 突触传递最重要的方式是神经化学传递。神经递质由突触前膜释放后与相应的突触后膜受体结合, 产生突触去极化电位或超极化电位, 导致突触后神经兴奋性升高或降低, 从而完成信息传递功能。神经元活动依赖于与神经递质相关的兴奋性和抑制性过程之间的平衡。

微囊藻毒素会导致神经递质途径的紊乱。Wu等<sup>[40]</sup>发现, 斑马鱼暴露于5和25  $\mu\text{g}/\text{L}$  MCLR 60天后, 多巴胺、多巴胺和血清素等神经递质的含量下降, 乙酰胆碱酯酶(AchE)活性显著降低。Yan等<sup>[41]</sup>在将斑马鱼胚胎暴露于0、0.3、3和30  $\mu\text{g}/\text{L}$ 的MCLR 90天后, 使用实时定量PCR检测了氨基酸g-氨基丁

酸(GABA)和谷氨酸代谢途径的mRNA表达水平, 发现3、30  $\mu\text{g}/\text{L}$ 组的 $\gamma$ -氨基丁酸A型受体(gabra1)、谷氨酸脱羧酶(gad1b)、谷氨酰胺酶(glsa)的mRNA表达显著增加, GABA转运蛋白(gat1)mRNA表达减少。

## 5 微囊藻毒素的免疫毒性

动物、人类和体外模型研究显示, 微囊藻毒素具有免疫毒性作用, 长期暴露于微囊藻毒素会损害机体的免疫反应, 进而可能增加包括癌症在内的各种疾病的风险<sup>[42]</sup>。微囊藻毒素可以通过多种机制改变免疫系统, 如淋巴细胞增殖减少、吞噬活动的调节、自然杀伤细胞(NK细胞)活动的调节<sup>[43]</sup>以及细胞因子合成的干扰<sup>[44]</sup>。异常的免疫系统对骨组织起破坏作用, 破坏骨小梁和皮质骨微结构, 导致骨质流失, 同时减少小鼠骨骼的矿物质密度<sup>[45]</sup>。

### 5.1 脾脏出现病理损伤和免疫反应

给大鼠注射MCLR 10  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$  50天后, 大鼠脾脏显著萎缩, 颜色加深。脾窦明显扩张, 脾小体呈弥漫性萎缩, 卵泡生发中心畸形, 淋巴细胞明显减少。毒素积累, 引起脾脏严重损伤, 最终损害机体免疫功能<sup>[46]</sup>。

对脾脏的病理和免疫基因表达的变化以及血清免疫参数进行的研究发现, 微囊藻毒素的亚慢性暴露对鱼类的先天免疫系统有双重影响。将雄性斑马鱼暴露于0.3、1、3、10和30  $\mu\text{g}/\text{L}$  MCLR 30天后, 发现在低暴露浓度下, 炎症激活, 但随着暴露浓度的增加而转化为免疫抑制。在低浓度组(0.3、1和3  $\mu\text{g}/\text{L}$ )中, 斑马鱼表现出了脾脏炎症的变化, 包括巨噬细胞中心的形成和巨噬细胞伪足的增加、血清C3水平的显著升高, 以及先天免疫相关基因(*c3b*、*lyz*、*il-1*等)的明显表达。与此相反, 高浓度组(10和30  $\mu\text{g}/\text{L}$ )的MCLR导致脾脏淋巴细胞和巨噬细胞的退化、免疫相关基因的下调, 以及血清C3水平的显著降低<sup>[47]</sup>。

### 5.2 细胞因子分泌和免疫细胞增殖异常

小鼠长时间暴露于微囊藻毒素可导致DNA损伤, 并抑制骨髓细胞的增殖和造血因子的变化, 导致骨髓细胞严重损伤<sup>[48]</sup>。小鼠白细胞中的彗星试验结果表明, 注射37.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  MCLR 30分钟后DNA断裂水平显著增加<sup>[49]</sup>。

Lankoff等<sup>[50]</sup>发现, 人和鸡的外周血淋巴细胞暴露于MCLR后, 白介素-2(IL-2)和白介素-6(IL-6)的产生受到影响, T和B淋巴细胞的增殖减少。Chen等<sup>[51]</sup>

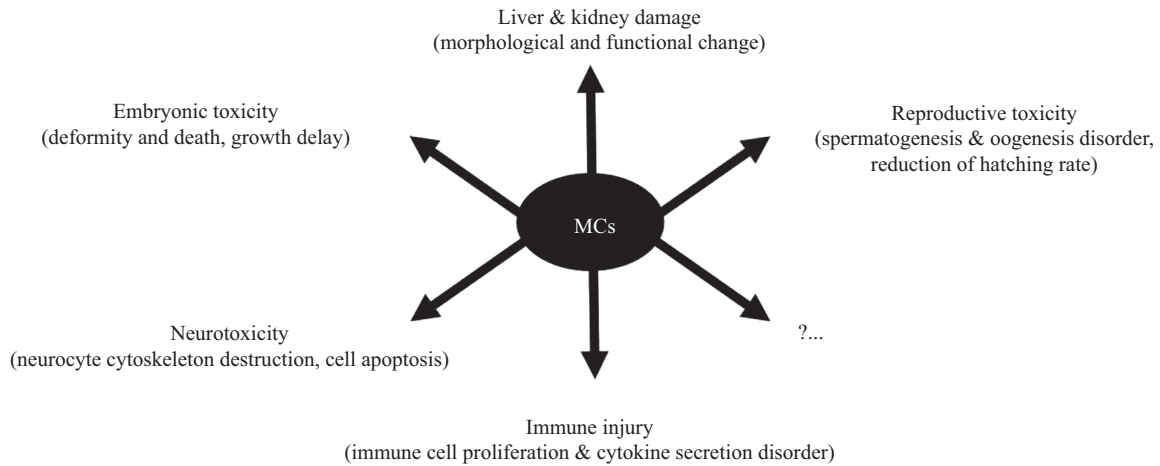


图1 微囊藻毒素多靶器官的毒性作用

Fig.1 Microcystin toxicity on multiple target organs

研究了MCLR对人类脐静脉内皮细胞(HUVECs)和C57BL/6小鼠的影响,发现肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白介素-1(IL-1)、白介素-6(IL-6),特别是白介素-8(IL-8)在内皮细胞和血清中的含量显著下降。

Palikova等<sup>[52]</sup>发现,喂养大鼠含有微囊藻毒素鱼肉28天后,大鼠红细胞计数(RBC)、红细胞比容(HCT)、平均红细胞血红蛋白量(MCH)、红细胞平均体积(MCV)和红细胞平均血红蛋白浓度(MCHC)发生显著改变,毒素通过抑制IFN产生和细胞因子合成导致了大鼠免疫细胞的抑制。

微囊藻毒素还可以激活中性粒细胞和巨噬细胞。中性粒细胞在调控癌症发展和自发性肿瘤的发生中起重要作用,活化的中性粒细胞可以释放ROS并作为宿主防御和碎片清除的重要环节,但同时也会造成组织损伤。Kujbida等<sup>[53]</sup>的研究表明, MCLR和[Asp<sup>3</sup>]-MCLR促进了人嗜中性粒细胞的迁移和ROS的形成及其杀伤能力。Chen等<sup>[54]</sup>以1、10、100和1 000 nmol/L的MCLR孵育小鼠巨噬细胞24小时,观察到了NO的产生和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的mRNA表达水平的下调。

## 6 结语和展望

微囊藻毒素通过抑制细胞内蛋白磷酸酶 PP1/PP2A,引起细胞内氧化应激与内质网应激等一系列分子机制引发多种组织器官的毒性作用。除了早已明确的肝毒性和后来确认的肾毒性,微囊藻毒素还具有连锁的生殖和胚胎发育毒性,体现了微囊藻毒素的跨代效应。微囊藻毒素在各种生物的性腺中积

累,影响生殖激素水平,对生殖系统产生负面影响。受精卵中大量存在的微囊藻毒素会传递到后代,导致胚胎发育毒性,具体表现为发育迟缓、胚胎畸形、胚胎死亡。此外,微囊藻毒素还对神经系统、免疫系统产生不利影响。如图1所示,随着对微囊藻毒素致毒机制的深入研究,可以预见还会有更多新的器官损伤或系统危害被发现。

微囊藻毒素对多种靶器官的毒性作用之间存在关联。微囊藻毒素导致肝细胞、肾脏细胞、神经细胞中的细胞骨架改变,并且引起DNA损伤和细胞凋亡,说明微囊藻毒素对不同靶器官毒性作用有相似的细胞学机制,在不同靶器官中PP2A都是微囊藻毒素的关键攻击分子。

胚胎生殖毒性作用对于人群的研究较少,目前主要限于动物实验。由于种属间生殖功能及微囊藻毒素在体内生物转化的差异,致使动物实验结果外推到人会有很大误差,因此,人群研究有待进一步加强。

虽然对微囊藻毒素神经毒性的研究日渐丰富,但目前确切的作用机制尚待完善,微囊藻毒素显著影响了氧化应激相关蛋白、细胞骨架蛋白、大分子物质代谢相关蛋白、信号通路及免疫等多方面蛋白的表达,说明微囊藻毒素的神经毒性作用机制复杂,涉及到很多方面,有待进一步研究揭示,包括微囊藻毒素和一些神经退行性疾病发生发展的联系。

微囊藻毒素可对免疫系统产生不利影响,但它对免疫功能的具体影响目前尚待查明。可以进一步应用动物和体外模型为微囊藻毒素相关免疫毒性的

潜在机制提供一些关键的理解, 免疫系统的损伤和肿瘤发生的关系, 是未来对微囊藻毒素研究的热点和方向。

### 参考文献 (References)

- 1 张占英, 俞顺章, 卫国荣, 陈伟炜. 微囊藻毒素LR在动物体内整体水平及细胞水平的分布. 中国毒理学杂志(Zhang zhanying, Yu shunzhang, Wei Guorong, Chen Weiwei. Study on the whole and cells level distribution of Microcystin LR in mice. *J Health Toxicology* 2002; 16 (1): 5-8.
- 2 Liu J, Wang B, Huang P, Wang H, Xu K, Xu L, *et al.* Microcystin-LR promotes cell proliferation in the mice liver by activating Akt and p38/ERK/JNK cascades. *Chemosphere* 2016; 163: 14-21.
- 3 Huang P, Wang B, Wang X, Xing M, Guo Z, Xu L. HEK293 cells exposed to microcystin-LR show reduced protein phosphatase 2A activity and more stable cytoskeletal structure when overexpressing  $\alpha 4$  protein. *Environ Toxicol* 2017; 32(1): 255-64.
- 4 Meng G, Liu J, Lin S, Guo Z, Xu L. Microcystin-LR-caused ROS generation involved in p38 activation and tau hyperphosphorylation in neuroendocrine (PC12) cells. *Environ Toxicol* 2015; 30(3): 366-74.
- 5 He J, Li G, Chen J, Lin J, Zeng C, Chen J, *et al.* Prolonged exposure to low-dose microcystin induces nonalcoholic steatohepatitis in mice: a systems toxicology study. *Arch Toxicol* 2017; 91(1): 465-80.
- 6 Pavagadhi S, Natera S, Roessner U, Balasubramanian R. Insights into lipidomic perturbations in zebrafish tissues upon exposure to microcystin-LR and microcystin-RR. *Environ Sci Technol* 2013; 47(24): 14376-84.
- 7 Bangjun Zhang, Yang Liu, Xiaoyu L. Alteration in the expression of cytochrome P450s (CYP1A1, CYP2E1, and CYP3A11) in the liver of mouse induced by microcystin-LR. *Toxins (Basel)* 2015; 7(4): 1102-15.
- 8 Caradonna F. Cytochrome P450 2E1 variable number tandem repeat polymorphisms and health risks: A genotype-phenotype study in cancers associated with drinking and/or smoking. *Mol Med Rep* 2012; 6: 416-20.
- 9 王昊, 徐立红. 微囊藻毒素研究的当前进展和未来方向. 水生生物学报(Wang Hao, Xu Lihong. The current developments and future directions in microcystins study. *Acta Hydrobiologica Sinica*) 2011; 35(3): 504-15.
- 10 Dias E1, Matos P, Pereira P, Batoréu MC, Silva MJ, Jordan P. Microcystin-LR activates the ERK1/2 kinases and stimulates the proliferation of the monkey kidney-derived cell line Vero-E6. *Toxicol In Vitro* 2010; 24(6): 1689-95.
- 11 Jacquet C, Thermes V, de Luze A, Puiseux-Dao S, Bernard C, Joly JS, *et al.* Effects of microcystin-LR on development of medaka fish embryos (*Oryzias latipes*). *Toxicol* 2004; 43(2): 141-7.
- 12 Huynh-Delerme C1, Ederly M, Huet H, Puiseux-Dao S, Bernard C, Fontaine JJ, *et al.* Microcystin-LR and embryo-larval development of medaka fish, *Oryzias latipes*. I. Effects on the digestive tract and associated systems. *Toxicol* 2005; 46(1): 16-23.
- 13 Guzman R E, Solter P F. Characterization of sublethal microcystin-LR exposure in mice. *Vet Pathol* 2002; 39: 17-26.
- 14 Zhao S, Xie P, Chen J, Liu L, Fan H. A proteomic study on liver impairment in rat pups induced by maternal microcystin-LR exposure. *Environ Pollut* 2016; 212: 197-207.
- 15 Liu Y, Song L, Li X, Liu T. The toxic effects of microcystin-LR on embryo-larval and juvenile development of loach, *Misgurnus mizolepis* Gunther. *Toxicol* 2002; 40(4): 395-9.
- 16 Saraf SR, Frenkel A, Harke MJ, Jankowiak JG, Gobler CJ, McElroy AE. Effects of microcystin on development of early life stage Japanese medaka (*Oryzias latipes*): Comparative toxicity of natural blooms, cultured *Microcystis* and microcystin-LR. *Aquat Toxicol* 2018; 194: 18-26.
- 17 Liu W, Qiao Q, Chen Y, Wu K, Zhang X. Microcystin-LR exposure to adult zebrafish (*Danio rerio*) leads to growth inhibition and immune dysfunction in F1 offspring, a parental transmission effect of toxicity. *Aquat Toxicol* 2014; 155: 360-7.
- 18 Zeng C, Sun H, Xie P, Wang J, Zhang G, Chen N, *et al.* The role of apoptosis in MCLR-induced developmental toxicity in zebrafish embryos. *Aquat Toxicol* 2014; 149: 25-32.
- 19 Forhead AJ1, Fowden AL2. Thyroid hormones in fetal growth and parturition. *J Endocrinol* 2014; 221(3): 87-103.
- 20 Cheng H, Yan W, Wu Q, Liu C, Gong X, Hung TC, *et al.* Parental exposure to microcystin-LR induced thyroid endocrine disruption in zebrafish offspring, a transgenerational toxicity. *Environ Pollut* 2017; 230: 981-8.
- 21 Yan W, Zhou Y, Yang J, Li S, Hu D, Wang J, *et al.* Waterborne exposure to microcystin-LR alters thyroid hormone levels and gene transcription in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in zebrafish larvae. *Chemosphere* 2012; 87(11): 1301-7.
- 22 Li Y, Sheng J, Sha J, Han X. The toxic effects of microcystin-LR on the reproductive system of male rats *in vivo* and *in vitro*. *Reprod Toxicol* 2008; 26(3/4): 239-45.
- 23 Chen Y, Wang J, Pan C, Li D, Han X. Microcystin-leucine-arginine causes blood-testis barrier disruption and degradation of occludin mediated by matrix metalloproteinase-8. *Cell Mol Life Sci* 2018; 75(6): 1117-32.
- 24 Li Y, Zhang M, Chen P, Liu R, Liang G, Yin L, *et al.* Effects of Microcystin-LR Exposure on Spermiogenesis in Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Int J Mol Sci* 2015; 16(9): 22927-37.
- 25 Zhang H, Cai C, Wu Y, Ye B, Han L, Shou X, Wang M, Wang J, Jia X. Toxic effects of microcystin-LR on the reproductive system of male *Rana nigromaculata in vitro*. *Aquat Toxicol* 2013; 126: 283-90.
- 26 Zhao Y, Xie L, Yan Y. Microcystin-LR impairs zebrafish reproduction by affecting oogenesis and endocrine system. *Chemosphere* 2015; 120: 115-22.
- 27 Wu J, Yuan M, Song Y, Sun F, Han X. MC-LR Exposure leads to subfertility of female mice and induces oxidative stress in granulosa cells. *Toxins (Basel)* 2015; 7(12): 5212-23.
- 28 Hou J, Li L, Wu N, Su Y, Lin W, Li G, *et al.* Reproduction impairment and endocrine disruption in female zebrafish after long-term exposure to MC-LR: A life cycle assessment. *Environ Pollut* 2016; 208: 477-85.
- 29 Wang X, Ding J, Xiang Z, Jiang P, Du J, Han X. Microcystin-LR causes sexual hormone disturbance in male rat by targeting gonadotropin-releasing hormone neurons. *Toxicol* 2016; 123: 45-55.
- 30 Wang X, Ying F, Chen Y, Han X. Microcystin (-LR) affects hormones level of male mice by damaging hypothalamic-pituitary

- system. *Toxicol* 2012; 59(2): 205-14.
- 31 Miller WL, Auchus RJ. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev* 2011; 32(1): 81-151.
- 32 Hou J, Su Y, Lin W, Guo H, Li L, Anderson DM, *et al.* Estrogenic potency of MC-LR is induced via stimulating steroidogenesis: *In vitro* and *in vivo* evidence. *Environ Pollut* 2018; 240: 615-22.
- 33 Jia X, Liu Z, Lu X, Tang J, Wu Y, Du Q, *et al.* Effects of MCLR exposure on sex hormone synthesis and reproduction-related genes expression of testis in male *Rana nigromaculata*. *Environ Pollut* 2018; 236: 12-20.
- 34 Hagenbuch B, Meier PJ. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/SLCO super family, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch* 2004; 447: 653-65.
- 35 Bulc Rozman K, Jurič DM, Šuput D. Selective cytotoxicity of microcystins LR, LW and LF in rat astrocytes. *Toxicol Lett* 2017; 265: 1-8.
- 36 Ding WX, Shen HM, Ong CN. Critical role of reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition in microcystin-induced rapid apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology* 2000; 32(3): 547-55.
- 37 Li G, Yan W, Dang Y, Li J, Liu C, Wang J. The role of calcineurin signaling in microcystin-LR triggered neuronal toxicity. *Sci Rep* 2015; 5: 11271
- 38 Fei Cai, Jue Liu, Cairong Li, and Jianghua Wang. Intracellular calcium plays a critical role in the microcystin-LR-elicited neurotoxicity through PLC/IP3 pathway. *Int J Toxicol* 2015; 34(6): 551-8
- 39 Li G, Cai F, Yan W, Li C, Wang J. A proteomic analysis of MCLR-induced neurotoxicity: implications for Alzheimer's disease. *Toxicol Sci* 2012; 127(2): 485-95.
- 40 Wu Q, Yan W, Cheng H, Liu C, Hung TC, Guo X, *et al.* Parental transfer of microcystin-LR induced transgenerational effects of developmental neurotoxicity in zebrafish offspring. *Environ Pollut* 2017; 231: 471-8.
- 41 Yan W, Li L, Li G, Zhao S. Microcystin-LR induces changes in the GABA neurotransmitter system of zebrafish. *Aquat Toxicol* 2017; 188: 170-6
- 42 Yaqoob Lone, Mangla Bhide, Raj Kumar Koiri. Microcystin-LR induced immunotoxicity in mammals. *J Toxicol*. 2016; 2016: 1-5.
- 43 Vitale M, Bassini A, Secchiero P, Mirandola P, Ponti C, Zamai L, *et al.* NK-active cytokines IL-2, IL-12, and IL-15 selectively modulate specific protein kinase C (PKC) isoforms in primary human NK cells. *Anat Rec* 2002; 266(2): 87-92.
- 44 Cooper M. A, Fehniger T. A, Caligiuri M. A. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001; 22(11): 633-40.
- 45 Hamid Y. Dar, Yaqoob Lone, Raj Kumar Koiri, Pradyumna K. Mishra, Rupesh K. Srivastava. Microcystin-leucine arginine (MC-LR) induces bone loss and impairs bone micro-architecture by modulating host immunity in mice: Implications for bone health. *Environ Pollut* 2018; 238: 792-802.
- 46 Li G, Yan W, Qiao Q, Chen J, Cai F, He Y, Zhang X. Global effects of subchronic treatment of microcystin-LR on rat splenic protein levels. *J Proteomics* 2012; 77: 383-93.
- 47 Lin W, Hou J, Guo H, Qiu Y, Li L, Li D, *et al.* Dualistic immunomodulation of sub-chronic microcystin-LR exposure on the innate-immune defense system in male zebrafish. *Chemosphere* 2017; 183: 315-22.
- 48 Zhou W, Zhang X, Xie P, Liang H, Zhang X. The suppression of hematopoiesis function in Balb/c mice induced by prolonged exposure of microcystin-LR. *Toxicol Lett* 2013; 219(2): 194-201.
- 49 Dias E, Louro H, Pinto M, Santos T, Antunes S, Pereira P, *et al.* Genotoxicity of microcystin-LR in *in vitro* and *in vivo* experimental models. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 9.
- 50 Lankoff A, Carmichael WW, Grasman KA, Yuan M. The uptake kinetics and immunotoxic effects of microcystin-LR in human and chicken peripheral blood lymphocytes *in vitro*. *Toxicology* 2004; 204(1): 23-40.
- 51 Chen L, Liu X, Pan Z, Liu S, Han H, Zhao C, *et al.* The role of IL-8/CXCR2 signaling in microcystin-LR triggered endothelial cell activation and increased vascular permeability. *Chemosphere* 2018; 194: 43-8.
- 52 Palikova M, Ondrackova P, Mares J, Adamovsky O, Pikula J, Kohoutek J, *et al.* *In vivo* effects of microcystins and complex cyanobacterial biomass on rats (*Rattus norvegicus var. alba*): changes in immunological and haematological parameters. *Toxicol* 2013; 73: 1-8.
- 53 Kujbida P, Hatanaka E, Campa A, Colepicolo P, Pinto E. Effects of microcystins on human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 341(1): 273-7.
- 54 Chen T, Zhao X, Liu Y, Shi Q, Hua Z, Shen P. Analysis of immunomodulating nitric oxide, iNOS and cytokines mRNA in mouse macrophages induced by microcystin-LR. *Toxicology* 2004; 197(1): 67-77.