

MC-LR对草鱼组织显微结构及*HO-1*、*IL-10R1*基因表达的影响

覃江凤

(杭州医学院基础医学与法医学院, 杭州 310053)

摘要 该项目主要研究微囊藻毒素-LR(microcystin-LR, MC-LR)对草鱼机体的毒害作用。草鱼经腹腔注射微囊藻毒素-LR的剂量为100 µg/kg, 0.5 h、1 h、3 h、6 h、12 h和24 h后对草鱼组织和血液采样, 然后进行组织显微结构和基因*HO-1*和*IL-10R1*的表达分析。(1) 通过光学显微镜观察, 肠道组织病理变化表现为肠绒毛上皮细胞脱落, 杯状细胞增多, 上皮细胞的细胞核变形; 6 h实验组出现肠道充血; 12 h实验组和24 h实验组肠绒毛黏膜固有层分离, 且有时间效应。(2) 采用荧光定量PCR技术对*HO-1*和*IL-10R1*基因进行检测, 结果显示草鱼鳃、肝脏、肠道、脾脏和心脏组织各实验组较对照组的*HO-1*基因表达量显著降低($P<0.05$), 同时草鱼脑、肝脏、肠道、脾脏组织和血液各实验组较对照组的*IL-10R1*基因表达量显著降低($P<0.05$)。微囊藻毒素-LR导致草鱼肠道、肝脏和鱼鳃等器官的病理损伤和*HO-1*和*IL-10R1*基因表达量显著降低, 可为MC-LR刺激草鱼的炎症反应与免疫反应提供相关理论依据。

关键词 微囊藻毒素-LR; 草鱼; 显微结构; *HO-1*; *IL-10R1*; 基因表达

Effects of Microcystin-LR on the Microstructure of Tissues and *HO-1*, *IL-10R1* Gene Expression of Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*)

QIN Jiangfeng

(School of Basic Medical Sciences and Forensic Medicine, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310053, China)

Abstract This project mainly studies the effect of MC-LR (microcystin-LR) on grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). The dose of MC-LR injected intraperitoneally to grass carp was 100 µg/kg, the tissues and blood of grass carp were sampled after 0.5 h, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h and 24 h. Then used for the study of tissue structure and the expression of *HO-1* and *IL-10R1* genes. (1) The results of microscopic structure showed that the intestinal villus epithelial cells were exfoliated, goblet cells were increased, and the nuclei of epithelial cells were deformed; intestinal congestion occurred in the experimental group at 6 h; the lamina propria of intestinal villi mucosa was separated in the 12 h and 24 h experimental groups. MC-LR has a time effect on grass carp. (2) The *HO-1* and *IL-10R1* genes were detected by fluorescence quantitative PCR. The results showed that the expression of *HO-1* genes in the gill, liver, intestine, spleen and heart of grass carp were significantly decreased compared with the control group ($P<0.05$). The expression of *IL-10R1* genes in the grain, liver, intestine, spleen and blood of grass carp were significantly decreased compared with the control group ($P<0.05$). MC-LR causes pathological damage to the intestine, liver, and gills of grass carp, and inhibits the genes expression of *HO-1* and *IL-10R1*, providing theoretical knowledge of the relevant mechanisms for MC-LR

收稿日期: 2023-03-13

接受日期: 2023-06-26

2020年度浙江省高等教育学会重点项目(批准号: KT2020023)和2023年度浙江省大学生创新创业项目(批准号: S202313023072)资助的课题

Received: March 13, 2023

Accepted: June 26, 2023

This work was supported by the Fund for Key Projects of Zhejiang Province Association for Higher Education in 2020 (Grant No.KT2020023) and Innovation and Entrepreneurship Projects of College Students in Zhejiang Province in 2023 (Grant No.S202313023072)

stimulating the inflammatory and immune responses of grass carp.

Keywords microcystin-LR; grass carp; microstructure; *HO-1*; *IL-10R1*; gene expression

随着社会经济和工业生产的快速发展,大量工业废水与生活污水排入水体之中,加快了水体富营养化,进而引发蓝藻水华。而在发现的微囊藻毒素中的变体已经有246种^[1-2],在两百多种已知结构的微囊藻毒素的变体之中,微囊藻毒素-LR(microcystin-LR, MC-LR)是毒性最强且危害最严重的^[3-4]。低剂量微囊藻毒素的持续存在也会对动物体和人体造成严重的危害,并能增加肿瘤发生率^[5-7]。以上的环境问题引起了全球的普遍关注^[8]。微囊藻毒素-LR对动物体和人类的危害作用已有下面一些研究:微囊藻毒素-LR对鱼类的胚胎发育和生长影响^[9]的研究;对肝脏、肾脏、脾脏等内部器官病理性变化的研究^[10-11];对鱼体氧化损伤^[12-13]等研究。

草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)是中国重要的淡水养殖鱼类,尽管是典型的草食性鱼类,但在人工养殖的过程中,其养殖水体经常爆发蓝藻水华,草鱼容易受到微囊藻毒素的胁迫。目前有较多文献开展了MC-LR对草鱼毒性的研究,研究发现MC-LR可诱导草鱼免疫毒性^[14-16]、肝毒性^[17-18]、肾毒性^[19]、肠毒性^[20]。

尽管隗黎丽等^[18]研究了MC-LR对草鱼抗氧化系统的影响,但没有进行血红素加氧酶1(heme oxygenase 1, *HO-1*)的相关研究。*HO-1*基因是细胞抵抗氧化压力的关键因素,该基因及蛋白是维持细胞的完整性和存活的关键因子。此外,WEI等^[15]报道了MC-LR对草鱼免疫相关基因的研究,但未见MC-LR对白细胞介素10受体1(interleukin-10 receptor 1, *IL-10R1*)影响的相关报道。*IL-10R1*是重要免疫调节基因,通过其配体*IL-10*参与免疫负性调节,在免疫反应中发挥抗炎的作用,从而维持机体内部免疫平衡^[21-22]。本实验对草鱼进行腹部注射MC-LR后,探索*HO-1*和*IL-10R1*基因的表达情况,观察肠、肝和鳃组织的显微结构,为MC-LR刺激草鱼的炎症反应与免疫反应提供相关机理的理论知识。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼

实验草鱼购于杭州环特生命科技股份有限公司,

平均体质量为(35.13±2.67) g,放入提前曝气的水族箱中,继续曝气充氧暂养3天,暂养期间每日按照鱼体质量的2.0%投喂商品饲料,实验前48 h停止投喂。实验草鱼暂养于杭州医学院实验动物中心;所有操作均符合杭州医学院实验动物中心管理暂行办法(杭医[2017]67号)的要求。

1.2 实验试剂

微囊藻毒素-LR购于上海源叶生物科技有限公司,毒素纯度≥95%,储存于-20℃冰箱中。石蜡切片实验所需的不同浓度的酒精、二甲苯和石蜡等均购自中国国药化学试剂有限公司;分子实验所需的RNAiso Plus、PrimeScript IV 1st Strand cDNA Synthesis Mix、Premix Taq和TB Green Premix Ex Taq II均购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.3 人工染毒

将实验用鱼分为染毒和对照两组,每组18条。首先将粉剂的MC-LR溶解于生理盐水中,配制成终浓度为50 μg/mL的MC-LR实验用注射毒素后,向草鱼腹腔注射MC-LR,注射的剂量为100 μg/kg BW(body weight),向对照组草鱼腹腔注射等体积的生理盐水。在注射毒素0.5 h、1 h、3 h、6 h、12 h和24 h后进行样本的采集,在每个时间点,染毒组和对照组各取3条鱼,用磷酸盐缓冲液冲洗鱼体后迅速取出样本组织,一部分样本保存于波恩氏固定液内;一部分样本保存于-80℃冰箱备用。

1.4 石蜡切片制作及观察

各组织小块固定于波恩氏固定液内,于24 h内进行常规梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,LeicaRM2135切片机(Leica公司,德国)连续切片,厚度为6 μm,苏木精和伊红(HE)染色,脱水后中性树脂胶封片,普通光学显微镜(Nikon)下观察各组织的变化,并进行拍照分析。

1.5 草鱼*IL-10R1*、*HO-1*基因的组织表达分析

1.5.1 总RNA提取 从-80℃冰箱中取出组织样本后,迅速加入1 mL Trizol试剂进行电动匀浆。将匀浆液冰上静置5 min后,用0.2 mL氯仿进行抽提、1 mL异丙醇沉淀、1 mL 75%酒精洗涤,加入50 μL DEPC-ddH₂O溶解,最后用Unano-1000对提取的RNA进行D值、浓度测定后,保存于-80℃冰箱备用。

表 1 荧光定量PCR扩增基因的引物

Table 1 The primers of genes used for quantitative real-time PCR analysis

基因名称	登录号	引物序列(5'→3')	扩增片段/bp
Gene name	GenBank No.	Primers (5'→3')	Amplicon size /bp
<i>IL-10R1</i>	KF129394.1	Forward: GGA TGG ATA TCG TAG TCA GAG	182
		Reverse: TCC TGG TTT TGC ACC ACA TGC	
<i>HO-1</i>	MG821475.1	Forward: ACA TGC CTA TAC ACG CTA TCT CG	132
		Reverse: CGT CAC TCC AGG AAA TGA GAA GA	
<i>β-actin</i>	MT119965.1	Forward: AGC CAT CCT TCT TGG GTA TG	106
		Reverse: GGT GGG GCG ATG ATC TTG A	

1.5.2 cDNA第一链的制备 从-80℃冰箱拿出RNA样品,在0.2 mL的PCR管中依次加入: 4.0 μL的5× PrimeScript IV 1st Strand cDNA Synthesis Mix、2 μL的Random 6 mers (50 μmol/L)、2 μL的模板RNA(1 μg/μL)、12 μL的RNase Free ddH₂O; 最后配制成20 μL的反应终体系。充分混合,放到PCR仪上按下列条件进行反应: 30℃预热10 min; 42℃ RNA合成cDNA反应20 min; 75℃酶失活处理15 min。反应结束后,保存于-20℃冰箱备用。

1.5.3 荧光定量PCR实验 我们选用β-actin作为内参基因,通过qPCR方法检测*HO-1*和*IL-10R1*基因在草鱼脑、鳃、肌肉、肝、肾、脾、肠、心脏和血液组织中在6个不同时间点的表达情况。向八连管中依次加入12.5 μL的TB Green Premix ExTaq(2×),正向引物和反向引物各0.8 μL,2.0 μL cDNA模板和8.9 μL的ddH₂O,反应终体系为25 μL,整个加样过程需在冰上操作。加样完毕后置于qPCR仪(Bio-Rad CFX96)上,反应条件为: 95℃热启动30 s, 95℃变性5 s、60℃退火10 s, 40个循环。熔解曲线程序: 95℃变性0.05 s, 65℃退火0.05 s,从65℃开始至95℃分析熔解曲线,每个循环升温0.5℃。反应所有引物见表1,其中引物参考了文献[16-17]。实验数据采用2^{-ΔΔCt}法进行处理,实验结果以实验组基因相对于对照组基因表达变化倍数表示。

1.5.4 数据处理 实验数据均以平均值±标准差表示,采用多因素方差分析进行统计学检验(SPSS 16.0),统计学显著性水平设定**P*<0.05表示差异显著,***P*<0.01即为差异极显著。

2 结果

2.1 MC-LR对草鱼机体各组织显微结构的影响

2.1.1 肠道 对照组肠道组织(0 h)没有发生明显的病理损伤,肠道绒毛形态完整,肠上皮细胞排列整齐

(图1A);各实验组(0.5 h至24 h)较对照组的杯状细胞增多;6 h、12 h、24 h实验组草鱼肠道充血;12 h实验组肠绒毛上皮细胞脱落,甚至细胞溶解;上皮细胞核变形;3 h和24 h实验组肠绒毛黏膜固有层分离,上皮细胞连接的致密结构被破坏(图1)。

2.1.2 肝脏 对照组(0 h)肝脏组织没有发生明显的病理损伤,细胞形态完整、排列整齐(图2A);各实验组(0.5 h至24 h)细胞核变形,甚至细胞核溶解;3 h、6 h、12 h和24 h实验组的肝脏组织出血(1 h至24 h)(图2)。

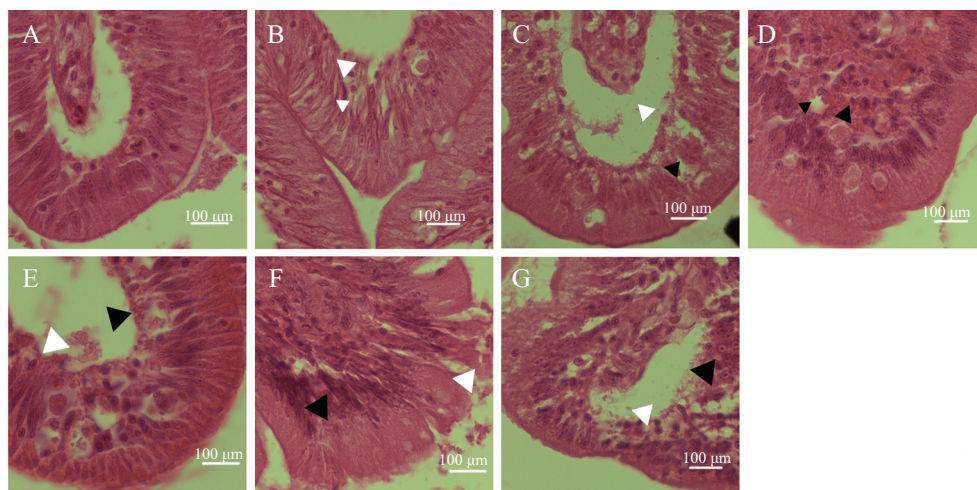
2.1.3 鳃 对照组(0h)鳃组织鳃丝没有发生明显的病理损伤,呼吸上皮完整,柱细胞和血窦形态排列整齐(图3A);0.5 h和1 h实验组鳃丝上呼吸上皮部分溶解,3 h、6 h、12 h、24 h实验组呼吸上皮部分和柱状细胞溶解,此外12 h、24 h实验组还出现嗜伊红细胞大量溶解,鳃丝结构不完整(图3)。

2.2 MC-LR对草鱼机体各组织机体基因表达的影响

利用荧光定量PCR仪(Bio-Rad CFX96)和TB Green® Premix Ex Taq™ II试剂盒测得*HO-1*基因和*IL-10R1*基因单一尖锐峰的熔解曲线(图4和图5),证明反应产物特异性好,此时定量准确。

2.3 草鱼*IL-10R1*和*HO-1*基因组织分布特征分析

对正常组草鱼脑、鳃、肌肉、肝、肾、脾、肠、心脏和血液9种组织中草鱼*HO-1*和*IL-10R1*基因的表达进行了qPCR分析,发现草鱼*HO-1*和*IL-10R1*基因在所有检测的组织中均有表达。*HO-1*和*IL-10R1*基因都是在肝脏中的表达量最为丰富,其次为肾脏、脾脏、鳃和心脏等,在肌肉中表达量相对较低(图6)。*HO-1*和*IL-10R1*在健康草鱼机体各组织内的相对表达量,以肝的含量为1,*HO-1*在各个组织中的含量顺序为:肌<心<肾<鳃<血<脑<肠<脾<肝(图6);*IL-10R1*在各个组织中的含量顺序为:肌<脾<心<鳃<肠<脑<血<肾<肝(图6)。其他各器官中*HO-1*和*IL-10R1*基因

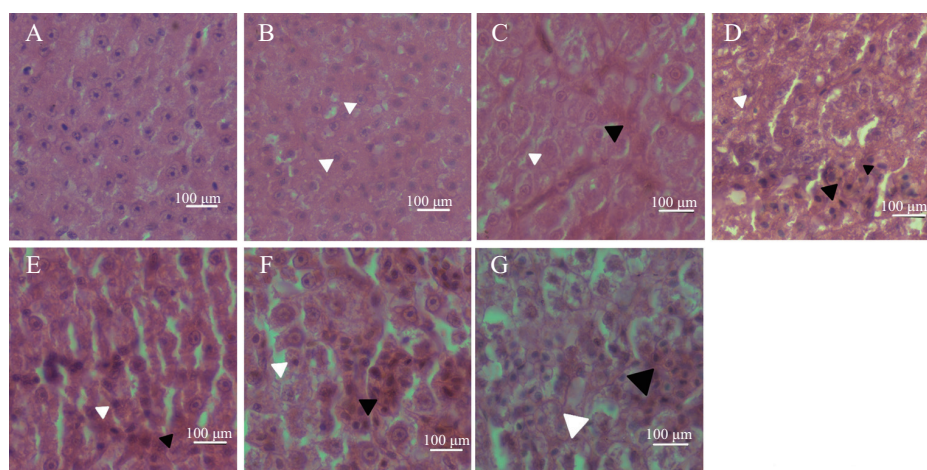


A~G: 肠道HE染色切片。A为对照组; B为0.5 h实验组; C为1 h实验组; D为3 h实验组; E为6 h实验组; F为12 h实验组; G为24 h实验组; 白色三角形为肠绒毛上皮细胞脱落; 黑色三角形为肠道组织充血。

A-G: HE stained intestine section. A: the control group; B: treatment group of 0.5 h; C: treatment group of 1 h; D: treatment group of 3 h; E: treatment group of 6 h; F: treatment group of 12 h; G: treatment group of 24 h; white triangle indicates epithelial cells of intestinal villus falled off; black triangle indicates intestinal tissue congestion.

图1 不同时间段MC-LR对草鱼肠道的影响

Fig.1 Effect of MC-LR at different time on intestine of grass carp



A~G: 肝脏HE染色切片。A为对照组; B为0.5 h实验组; C为1 h实验组; D为3 h实验组; E为6 h实验组; F为12 h实验组; G为24 h实验组; 白色三角形为肝细胞核变形; 黑色三角形为肝脏组织充血。

A-G: HE stained liver section. A: the control group; B: treatment group of 0.5 h; C: treatment group of 1 h; D: treatment group of 3 h; E: treatment group of 6 h; F: treatment group of 12 h; G: treatment group of 24 h; white triangle indicates liver cell nucleus deformation; black triangle indicates liver congestion.

图2 不同时间段MC-LR对草鱼肝脏的影响

Fig.2 Effect of MC-LR at different time on liver of grass carp

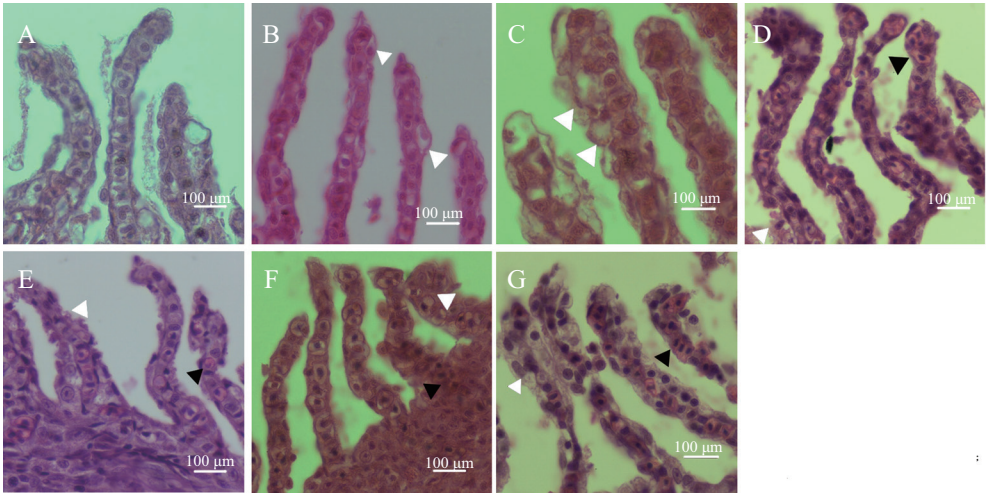
表达量极显著低于肝脏中的的表达量($P < 0.01$)。

2.4 草鱼*HO-1*和*IL-10R1*基因qPCR的表达分析

用100 $\mu\text{g/kg}$ 剂量MC-LR诱导草鱼经过不同时间(0 h、0.5 h、1 h、3 h、6 h、12 h、24 h)处理后,采用qPCR方法检测分析草鱼组织中的*HO-1*和*IL-10R1*在不同时间点的相对表达量。

2.4.1 鳃 鱼鳃*HO-1*和*IL-10R1*的mRNA转录水平

出现不同程度的降低。鱼鳃*HO-1*的mRNA转录水平在各个实验组极显著低于对照组($P < 0.01$),特别是1 h、3 h、6 h、12 h、24 h的实验组的表达量几乎为零(图7A)。鱼鳃*IL-10R1*的mRNA转录水平在6 h、12 h、24 h的实验组极显著低于对照组($P < 0.01$),而0.5 h、1 h、3 h的实验组与对照组相比虽然相对表达降低,但没有显著性差异($P > 0.05$)(图7B)。



A~G: 鱼鳃HE染色切片。A为对照组; B为0.5 h实验组; C为1 h实验组; D为3 h实验组; E为6 h实验组; F为12 h实验组; G为24 h实验组; 白色三角形为鳃丝上皮细胞脱落; 黑色三角形为鳃丝充血。
A-G: HE stained gill section. A: the control group; B: treatment group of 0.5 h; C: treatment group of 1 h; D: treatment group of 3 h; E: treatment group of 6 h; F: treatment group of 12 h; G: treatment group of 24 h; white triangle indicates xfoliation of gill epithelial cells; black triangle indicates gill congestion.

图3 不同时间段MC-LR对草鱼鱼鳃的影响
Fig.3 Effect of MC-LR at different time on gill of grass carp

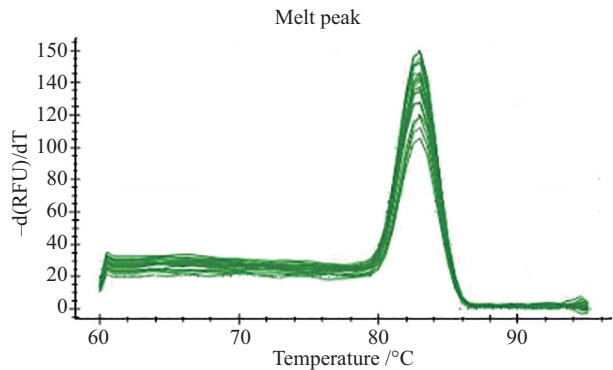


图4 草鱼*HO-1*基因熔解曲线图
Fig.4 Melt pert of *HO-1* gene in tissues of grass carp

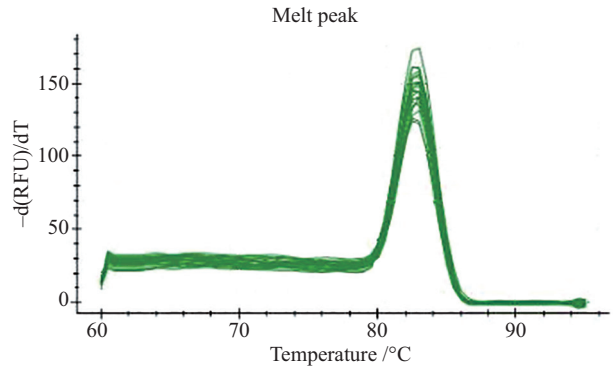


图5 草鱼*IL-10R1*基因熔解曲线图
Fig.5 Melt pert of *IL10-R1* gene in tissues of grass carp

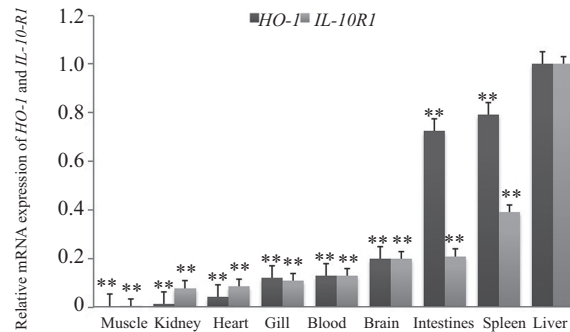
2.4.2 肝脏 肝脏组织*HO-1*和*IL-10R1*的mRNA转录水平出现不同程度的降低。肝脏组织*HO-1*和*IL-10R1*的mRNA转录水平在各个实验组极显著低于对

照组($P<0.01$)(图8)。*IL-10R1*的mRNA相对表达量在各实验组中几乎为零(图8B)。
2.4.3 肠道 肠道组织*HO-1*和*IL-10R1*的mRNA转

录水平出现不同程度的降低。*HO-1*实验组1 h、24 h以及*IL-10R1*实验组1 h的mRNA转录水平均显著低于对照组($P<0.05$)(图9); 0.5 h、3 h、6 h、12 h *HO-1*实验

组和(0.5 h、3 h、6 h、12 h、24 h) *IL-10R1*实验组的mRNA转录水平极显著低于对照组($P<0.01$)(图9)。

2.4.4 肌肉 肌肉组织*HO-1*和*IL-10R1*的mRNA

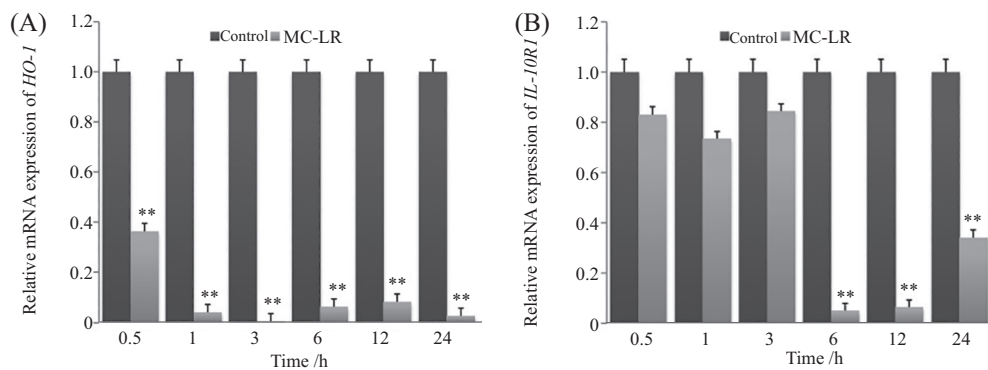


** $P<0.01$, 与肝脏实验组比较。

** $P<0.01$ vs liver group.

图6 *HO-1*和*IL-10R1*基因在草鱼机体各组织内的相对表达量

Fig.6 Relative expression of *HO-1* and *IL-10R1* genes in tissues of grass carp



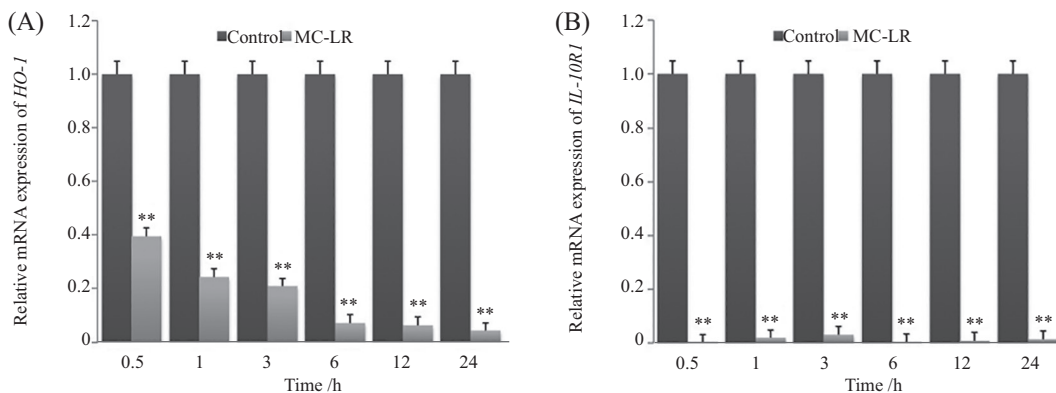
A: 不同时间点*HO-1*基因在草鱼鳃内的相对表达量; B: 不同时间点*IL-10R1*基因在草鱼鳃内的相对表达量。 ** $P<0.01$, 与对照组比较。

A: relative expression of *HO-1* gene in the gills of grass carp at different times; B relative expression of *IL-10R1* gene in the gills of grass carp at different times.

** $P<0.01$ vs control group.

图7 不同时间点*HO-1*和*IL-10R1*基因在草鱼鳃内的相对表达量

Fig.7 Relative expression of *HO-1* and *IL-10R1* genes in the gills of grass carp at different times



A: 不同时间点*HO-1*基因在草鱼肝脏内的相对表达量; B: 不同时间点*IL-10R1*基因在草鱼肝脏内的相对表达量。 ** $P<0.01$, 与对照组比较。

A: relative expression of *HO-1* gene in the liver of grass carp at different times; B: relative expression of *IL-10R1* gene in the liver of grass carp at different times. ** $P<0.01$ vs control group.

图8 不同时间点*HO-1*和*IL-10R1*基因在草鱼肝脏内的相对表达量

Fig.8 Relative expression of *HO-1* and *IL-10R1* genes in the liver of grass carp at different times

转录水平出现不同程度的降低。草肌肉*HO-1*和*IL-10R1*的mRNA转录水平在0.5 h和12 h实验组下降不显著($P>0.05$);在1 h、3 h、24 h实验组与对照组差异显著($P<0.05$);而6 h实验组极显著低于对照组($P<0.01$)(图10)。

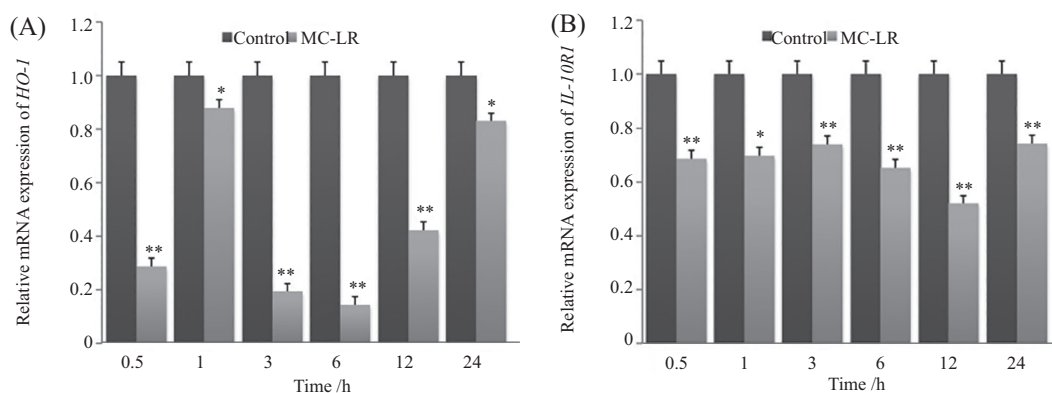
2.4.5 脾脏 脾脏组织*HO-1*和*IL-10R1*的mRNA转录水平出现不同程度的降低。草脾脏*HO-1*和*IL-10R1*的mRNA转录水平在1 h、6 h、12 h实验组显著低于对照组($P<0.05$);在0.5 h、3 h、24 h实验组极显著低于对照组($P<0.01$)(图11)。

2.4.6 血液 血液*HO-1*和*IL-10R1*的mRNA转录水平出现不同程度的降低。草鱼血液*HO-1*和*IL-10R1*的mRNA转录水平在0.5 h实验组下降不显著

($P>0.05$), 1 h、6 h、12 h实验组显著低于对照组($P<0.05$);在3 h、24 h实验组极显著低于对照组($P<0.01$)。而且*IL-10R1*的mRNA相对表达量在各实验组中都低于0.2(图12)。

2.4.7 肾脏 肾脏*HO-1*和*IL-10R1*的mRNA转录水平出现不同程度的下降。草鱼肾脏*HO-1*和*IL-10R1*的mRNA转录水平在12 h下降不显著($P>0.05$), 0.5 h、1 h、3 h、24 h实验组显著低于对照组($P<0.05$);在6 h实验组极显著低于对照组($P<0.01$)(图13)。

2.4.8 心脏 心脏*HO-1*和*IL-10R1*的mRNA转录水平出现不同程度的降低。草鱼心脏*IL-10R1*的mRNA转录水平在0.5 h、3 h、12 h下降不显著($P>0.05$); 0.5 h、3 h、6 h实验组的*HO-1* mRNA转录水平显著

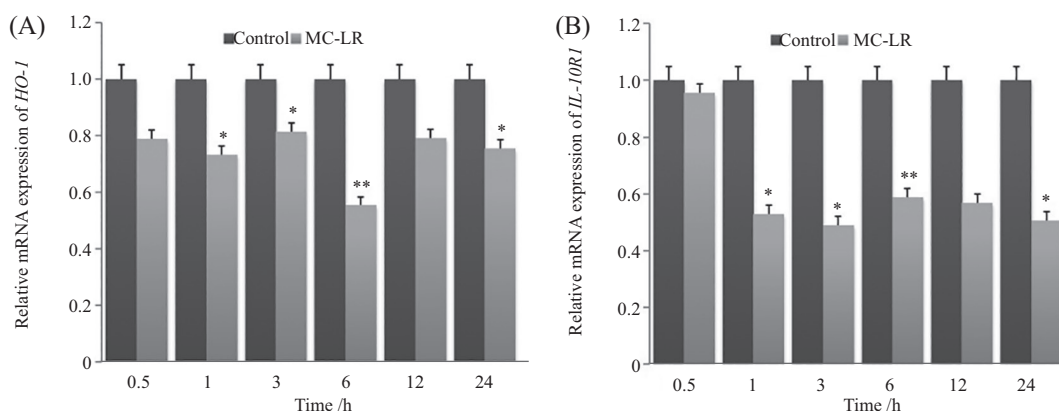


A: 不同时间点*HO-1*基因在草鱼肠道内的相对表达量; B: 不同时间点*IL-10R1*基因在草鱼肠道内的相对表达量。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与对照组比较。

A: relative expression of *HO-1* gene in the intestine of grass carp at different times; B: relative expression of *IL-10R1* gene in the intestine of grass carp at different times. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control group.

图9 不同时间点*HO-1*和*IL-10R1*基因在草鱼肠道内的相对表达量

Fig.9 Relative expression of *HO-1* and *IL-10R1* genes in the intestine of grass carp at different times

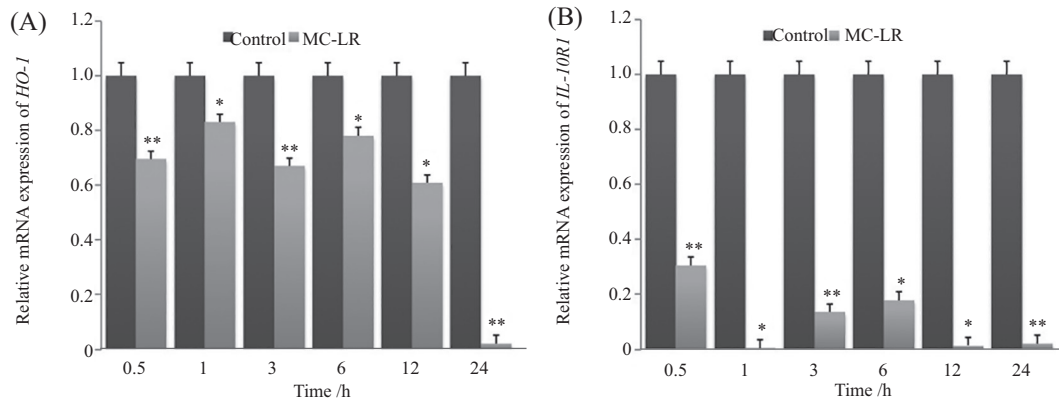


A: 不同时间点*HO-1*基因在草鱼肌肉内的相对表达量; B: 不同时间点*IL-10R1*基因在草鱼肌肉内的相对表达量。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与对照组比较。

A: relative expression of *HO-1* gene in the muscle of grass carp at different times; B: relative expression of *IL-10R1* gene in the muscle of grass carp at different times. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control group.

图10 不同时间点*HO-1*和*IL-10R1*基因在草鱼肌肉内的相对表达量

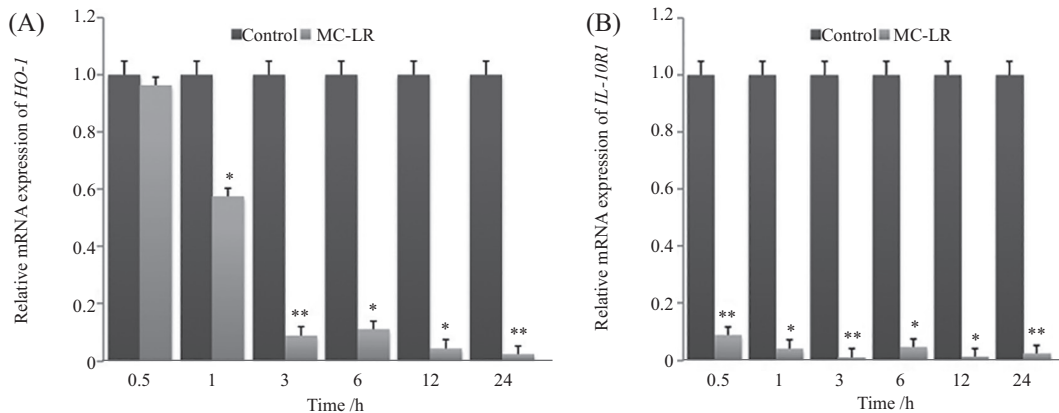
Fig.10 Relative expression of *HO-1* and *IL-10R1* genes in the muscle of grass carp at different times



A: 不同时间点 $HO-1$ 基因在草鱼脾脏内的相对表达量; B: 不同时间点 $IL-10R1$ 基因在草鱼脾脏内的相对表达量。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与对照组比较。
A: relative expression of *HO-1* gene in the spleen of grass carp at different times; B: relative expression of *IL-10R1* gene in the spleen of grass carp at different times. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control group.

图11 不同时间点 $HO-1$ 和 $IL-10R1$ 基因在草鱼脾脏内的相对表达量

Fig.11 Relative expression of *HO-1* and *IL-10R1* genes in the spleen of grass carp at different times



A: 不同时间点 $HO-1$ 基因在草鱼血液内的相对表达量; B 不同时间点 $IL-10R1$ 基因在草鱼血液内的相对表达量。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与对照组比较。
A: relative expression of *HO-1* gene in the blood of grass carp at different times; B: relative expression of *IL-10R1* gene in the blood of grass carp at different times. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control group.

图12 不同时间点 $HO-1$ 和 $IL-10R1$ 基因在草鱼血液内的相对表达量

Fig.12 Relative expression of *HO-1* and *IL-10R1* genes in the blood of grass carp at different times

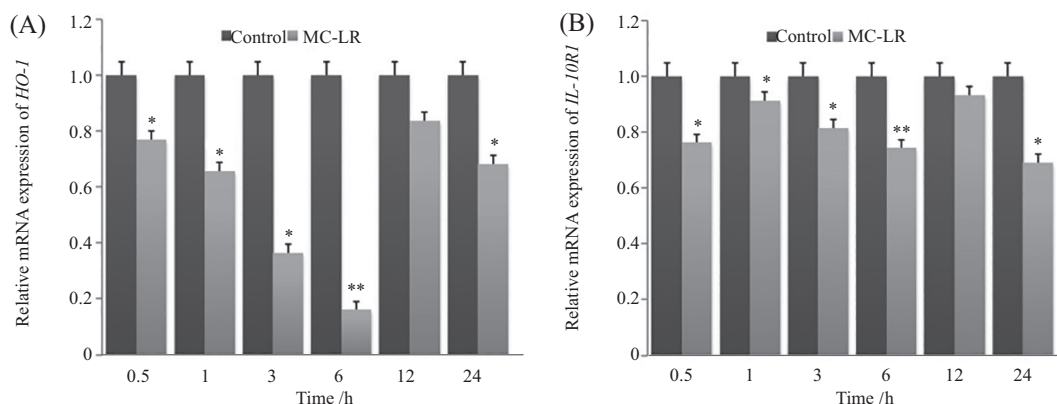
低于对照组, 6 h实验组的 $IL-10R1$ mRNA转录水平显著低于对照组($P<0.05$); 1 h、12 h、24 h实验组的 $HO-1$ mRNA转录水平极显著低于对照组($P<0.01$); 1 h、24 h实验组 $IL-10R1$ 的mRNA转录水平极显著低于对照组($P<0.01$)(图14)。

2.4.9 鱼脑 鱼脑 $HO-1$ 和 $IL-10R1$ 的mRNA转录水平出现不同程度的降低。草鱼鱼脑 $HO-1$ 的mRNA转录水平在12 h、24 h实验组下降不显著($P>0.05$); 0.5 h、3 h实验组的 $HO-1$ mRNA转录水平显著低于对照组($P<0.05$)(图15A)。各个实验组 $IL-10R1$ 的mRNA转录水平都极显著低于对照组($P<0.01$)(图15B)。 $IL-10R1$ 的mRNA相对表达量在各实验组中几乎为零(图15B)。

3 讨论

3.1 MC-LR导致草鱼机体各组织显微结构的病理变化

鱼类处于水生生态系统的最高营养级, 微囊藻毒素-LR可以通过口、鳃或者皮肤进入鱼的身体内, 干扰鱼类的正常生长发育, 危害鱼类种群的安全。本项目通过腹腔注射MC-LR, 发现草鱼的肠道、肝脏和鳃丝都受到了严重损伤。从0.5 h实验组草鱼肠道内肠绒毛的上皮细胞轻微脱落、肝脏细胞核变形、鳃丝上呼吸上皮和柱状细胞的部分溶解, 到24 h实验组的肠绒毛上皮细胞断裂、肝脏细胞核溶解、鳃丝上呼吸上皮和柱状细胞的完全溶解, 说明随着染毒时间的推移, 草鱼机体组织显微机构受到的损伤

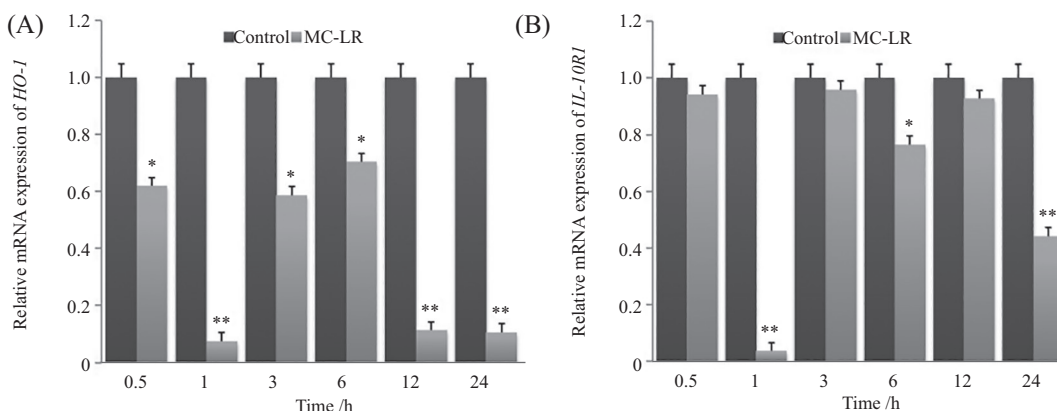


A: 不同时间点*HO-1*基因在草鱼肾脏内的相对表达量; B: 不同时间点*IL-10R1*基因在草鱼肾脏内的相对表达量。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与对照组比较。

A: relative expression of *HO-1* gene in the kidney of grass carp at different times; B: relative expression of *IL-10R1* gene in the kidney of grass carp at different times. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group.

图13 不同时间点*HO-1*和*IL-10R1*基因在草鱼肾脏内的相对表达量

Fig.13 Relative expression of *HO-1* and *IL-10R1* genes in the kidney of grass carp at different times



A: 不同时间点*HO-1*基因在草鱼心脏内的相对表达量; B: 不同时间点*IL-10R1*基因在草鱼心脏内的相对表达量。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与对照组比较。

A: relative expression of *HO-1* gene in the heart of grass carp at different times; B: relative expression of *IL-10R1* gene in the heart of grass carp at different times. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group.

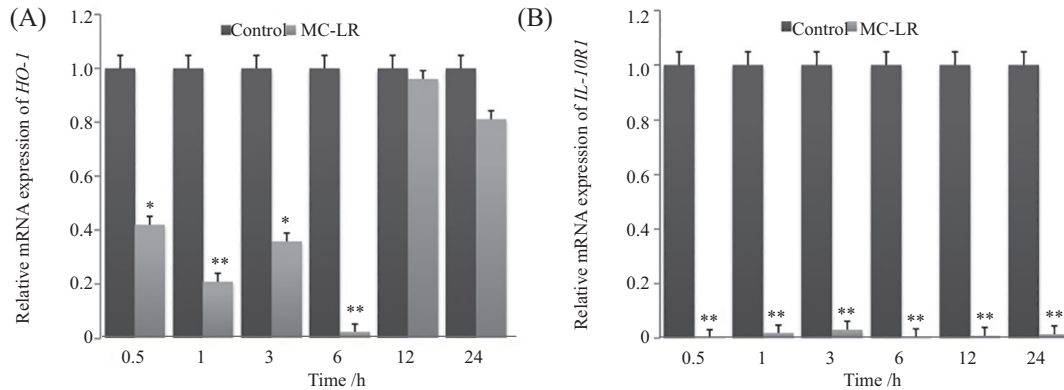
图14 不同时间点*HO-1*和*IL-10R1*基因在草鱼心脏内的相对表达量

Fig.14 Relative expression of *HO-1* and *IL-10R1* genes in the heart of grass carp at different times

越来越严重。还有一些研究的结论是, MC-LR对鱼体脾脏、肠道和鳃组织均造成严重的病理损伤, 且具有剂量依赖性^[23-24]。有许多研究学者发现, 鱼体染毒后MC在肠道中迅速累积后降解, 并造成时间-剂量依赖性组织损伤, 且低剂量组的病理损伤是可逆的^[25-27]。这可能与淋巴细胞浸润等免疫防御系统发挥了作用有关^[28-30], 但当MC-LR剂量足够大, 超过鱼体免疫防御能力时, 鱼体显微结构仍然会出现严重的损伤。本项目实验结果与以上研究的结论完全一致。本研究发现随着MC-LR在草鱼机体各组织的累积, 各实验组较对照组都有明显的病理损伤, 且具有时间-剂量的依赖性。

3.2 MC-LR对草鱼*HO-1*、*IL-10R1*基因表达的影响

随着养殖规模和养殖环境的变差, 近几年来MC-LR对水体的污染日趋严重。许多学者试图从鱼体免疫机理着手, 通过加强鱼体抗病和抗逆能力来提高养殖产量和质量, 其中细胞因子是研究热点之一。IL-10是机体的一种重要免疫因子, 是一种抑制性细胞因子, 可以由多种细胞产生, 近期有研究指出调节性T淋巴细胞(Treg)和调节性B淋巴细胞是体内IL-10的主要来源。与其他细胞因子一样, IL-10需与细胞膜表面的IL-10受体结合才能发挥作用。IL-10受体包括两部分, 即IL-10R1和IL-10R2。IL-10R2被



A: 不同时间点 $HO-1$ 基因在草鱼脑内的相对表达量; B 不同时间点 $IL-10R1$ 基因在草鱼脑内的相对表达量。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与对照组比较。

A: relative expression of $HO-1$ gene in the brain of grass carp at different times; B: relative expression of $IL-10R1$ gene in the brain of grass carp at different times. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control group.

图15 不同时间点 $HO-1$ 和 $IL-10R1$ 基因在草鱼脑内的相对表达量

Fig.15 Relative expression of $HO-1$ and $IL-10R1$ genes in the brain of grass carp at different times

认为是IFNR的组成部分, 不与IL-10发生结合, 只起到激发细胞内转导信号的作用^[31-32]。IL-10R1主要与配体相结合, 属于IL-10受体复合物的特异性部分, 而IL-10R2主要起辅助作用。在MC-LR的刺激下, $IL-10R1$ 基因表达量的升高可能会引起 $IL-10$ 基因发挥功能作用参与炎症及免疫反应; $IL-10R1$ 基因表达量的下调, 则能够限制和终止炎症反应。本项目的研究结果: 草鱼肝脏、脾脏组织和血液内的 $IL-10R1$ 基因的mRNA转录水平在各个实验组极显著低于对照组($P<0.01$)。与刘林等^[3]和郑亢等^[21]的研究结果完全一致。

HO-1是II相酶家族一个非常重要的成员, 最初是以热激动蛋白的身份被发现的, 其以突出的可诱导性、抗氧化等作用受到许多学者的关注。当生物体处于外界胁迫的条件下, HO-1可作为保护性蛋白被诱导, 以抵御各类氧化损伤, 起到保护细胞的作用。HO-1是鱼类较重要的免疫细胞因子, 在鱼类受到刺激, 发挥免疫功能时, 其表达多在肝脏和头肾组织中^[33-34]。本项目研究发现, 在草鱼肝脏、鱼鳃、脾脏、心脏和血液内的 $HO-1$ 基因的mRNA转录水平在各个实验组显著低于对照组($P<0.05$)。而在草鱼肠道、肌肉、肾脏和鱼脑组织内的 $HO-1$ 基因mRNA转录水平在0.5 h、1 h、3 h、6 h实验组的相对表达量不断降低, 6 h实验组的相对表达量达到最低, 12 h、24 h实验组的相对表达量又开始反弹, 有逐步升高的趋势。后续进一步的研究可以延长浸毒时间。而付春雪等^[35]研究表明, 鲢鱼在MC-LR的刺激下, 显示 $HO-1$ 基因在注射MC-LR 0.25 h后表达量显著升高,

在0.5 h时开始略有下降, 在1 h时表达量继续升高。 $IL-10R1$ 基因表达量在(0.25 h、0.5 h、1 h) 3个时间点均显著升高, 并处于持续上升趋势; 与本研究实验结果刚好相反。随着MC-LR在草鱼机体内各组织的累积, 各实验组较对照组都有不同程度的表达降低。

综上所述, 用100 $\mu\text{g/kg}$ 剂量MC-LR刺激草鱼后, $HO-1$ 和 $IL-10R1$ 基因的表达都受到了抑制, $IL-10R1$ 基因在各实验组中的相对表达量几乎为零。MC-LR导致肠道、肝脏和鳃丝的病理损伤严重, 甚至各器官都有充血的现象。这为后续MC-LR刺激草鱼的炎症反应和免疫反应提供了理论参考。

参考文献 (References)

- [1] 顾毓蓉, 程晨, 赵雁雁, 等. 微囊藻毒素异构体产生的调控因子及其在自然水体中分布的研究进展[J]. 生态毒理学报(GU Y R, CHEN C, ZHAO Y Y, et al. Study on the regulatory factors for the production of microcystin isomers and their distribution in natural waters research progress [J]. Journal of Ecotoxicology), 2022, 17(4): 17-32.
- [2] MERILUOTO J, SPOOF L, CODD G A. Handbook of cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis [M]. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd., 2017: 145-6.
- [3] 刘林, 何丽, 吴富盛, 等. 草鱼 $IRE1$ -like基因的克隆、组织表达及其对微囊藻毒素-LR的响应[J]. 水生生物学报(LIU L, HE L, WU F S, et al. Cloning and tissue expression of grass carp $IRE1$ -like gene and its response to microcystin-LR [J]. Journal of Aquatic Biology), 2020, 44(6): 1168-73.
- [4] FUNARI E, TESTAI E. Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure [J]. Crit Rev Toxicol, 2008, 38(2): 97-125.
- [5] 何丽, 阮记明, 刘毅, 等. 草鱼自噬相关基因 $Beclin1$ 的克隆及其在MC-LR胁迫下的表达特征[J]. 水生生物学报(HE L, RUAN J M, LIU Y, et al. Cloning of grass carp autophagy-related gene $Beclin1$ and its expression characteristics under MC-LR stress [J].

- Journal of Hydrobiology), 2019, 43(3): 479-85.
- [6] LI X Y, LI J, MENG F X, et al. Hepatotoxicity and immunotoxicity of MC-LR on silver carp [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2019, 169: 28-32.
 - [7] 钱小兰. 低剂量微囊藻毒素对原代大鼠肝细胞促增殖效应的分子机制研究[D]. 上海: 复旦大学, 2013: 1-78.
 - [8] 陈华, 林祥吉, 汪家梨, 等. 微囊藻毒素-LR抑制小鼠淋巴细胞免疫功能的体外研究[J]. *癌变·畸变·变*(CHEN H, LIN X J, WANG J L, et al. *In vitro* study of microcystin-LR inhibiting lymphocyte immune function in mice [J]. *Cancer • Distortion • Change*), 2009, 22(1): 48-51.
 - [9] 黄树辉, 马建腾, 章尼娜, 等. 微囊藻毒素-LR和二甲苯对斑马鱼胚胎的毒性作用[J]. *环境与健康杂志*(HUANG S H, MA J T, ZHANG N N, et al. Toxic effects of microcystin-LR and xylene on zebrafish embryos [J]. *Journal of Environment and Health*), 2013, 30(4): 308-11.
 - [10] CHEN C Y, LIU W J, WANG L, et al. Pathological damage and immunomodulatory effects of zebrafish exposed to microcystin-LR [J]. *Toxicon*, 2016, 118:13-20.
 - [11] CHEN J, XIE P, LI L, et al. First identification of the hepatotoxic microcystins in the serum of a chronically exposed human population together with indication of hepatocellular damage [J]. *Toxicology Science*, 2009, 108(1): 81-9.
 - [12] WEI L L, LIU Y, ZHONG S, et al. Transcriptome analysis of grass carp provides insights into the immune-related genes and pathways in response to MC-LR induction [J]. *Aquaculture*, 2018, 488: 207-16.
 - [13] QI M, DANG Y, XUA Q L, et al. Microcystin-LR induced developmental toxicity and apoptosis in zebrafish (*Danio rerio*) larvae by activation of ER stress response [J]. *Chemosphere*, 2016, 157: 166-73.
 - [14] WEI L L, SUN B J, NIE P. Ultrastructural alteration of lymphocytes in spleen and pronephros of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) experimentally exposed to microcystin-LR [J]. *Aquaculture*. 2008, 280(1/2/3/4): 270-5.
 - [15] WEI L L, SUN B J, CHANG M X, et al. The effects of cyanobacterial toxin microcystin-LR on the transcription of immune-related genes in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Environ Biol Fish*, 2009, 85(3): 231-8.
 - [16] 隗黎丽, 刘毅, 王自蕊, 等. MC-LR急性胁迫对草鱼脾脏、头肾显微结构及*BAFF*和*APRIL*基因表达的影响[J]. *农业环境科学学报*(WEI L L, LIU Y, WANG Z R, et al. Effects of MC-LR acute stress on the microstructure of spleen, head and kidney and the expression of BAFF and APRIL genes in grass carp [J]. *Journal of Agricultural and Environmental Sciences*), 2017, 36(12): 2379-87.
 - [17] 隗黎丽, 何丽, 阮记明, 等. 草鱼幼鱼肝胰脏抗氧化系统对MC-LR胁迫的响应[J]. *农业环境科学学报*(WEI L L, HE L, RUAN J M, et al. Response of hepatopancreas antioxidant system of juvenile grass carp to MC-LR stress [J]. *Journal of Agricultural and Environmental Sciences*), 2019, 38(1): 44-50.
 - [18] 林长高, 刘林, 王辉, 等. 基于RNA-Seq技术分析微囊藻毒素-LR对草鱼肝脏脂质代谢的影响[J]. *江西农业大学学报*(LIN C G, LIU L, WANG H, et al. The effect of microcystin-LR on lipid metabolism of grass carp liver was analyzed based on RNA-Seq technology [J]. *Journal of Jiangxi Agricultural University*), 2022, 44(1): 166-74.
 - [19] HE L, LIU L, LIN C G, et al. Effects of MC-LR on histological structure and cell apoptosis in the kidney of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Fish Physiol Biochem*, 2020, 46(6): 2005-14.
 - [20] 隗黎丽, 刘瑜, 吴华东, 等. MC-LR对草鱼肠道显微结构和炎症相关细胞因子表达的影响[J]. *环境科学学报*(WEI L L, LIU Y, WU H D, et al. Effects of MC-LR on intestinal microstructure and expression of inflammatory cytokines in grass carp [J]. *Journal of Environmental Science*), 2018, 38(2): 829-36.
 - [21] 郑亢, 郇玉峰, 潘高峰, 等. *IL-10R*基因多态性与乙型肝炎病毒感染慢性化的相关性[J]. *安徽医科大学学报*(ZHENG K, GAO Y F, PAN G F, et al. The relationship between the polymorphism of IL-10R gene and the chronic hepatitis B virus infection [J]. *Journal of Anhui Medical University*), 2015, 50(5): 632-4.
 - [22] DIMITROPOULOU D, KARAKANTZA M, THEODOROU G L, et al. Serum cytokine profile in patients with hepatitis B antigen-negative chronic active hepatitis B and inactive hepatitis B virus carriers [J]. *World J Gastrointest Pathophysiol*, 2013, 4(1): 7-24.
 - [23] 陈传悦. 微囊藻毒素microcystin-LR斑马鱼组织病理损伤和免疫调节的影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016: 1-52.
 - [24] CHEN X, HAN K, ZHANG T, et al. Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) NRF2 alleviates the oxidative stress and enhances cell viability through upregulating the expression of *HO-1* [J]. *Fish Physiol Biochem*, 2020, 46(1): 417-28.
 - [25] FISHER W J, HITZFELD B C, TENCALLA F. Microcystin-LR toxicodynamics, induced pathology, and immune histochemical localization in livers of blue-green algae exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Toxicol Sci*, 2000, 54(2): 365-73.
 - [26] 李莉, 雷和花, 侯杰. 微囊藻毒素在银鲫肠道中的累积及其病理学影响[J]. *生态毒理学报*(LI L, LEI H H, HOU J. The accumulation of microcystins in the intestine of crucian carp and their pathological effects [J]. *Journal of Ecotoxicology*), 2014, 9(6): 1189-96.
 - [27] 刘林, 何丽, 林长高, 等. 微囊藻毒素-LR对鲤鱼上皮瘤细胞活力及显微、超微结构的影响[J]. *江西农业大学学报*(LIU L, HE L, LIN C G, et al. Effects of microcystin-LR on the viability, microstructure and ultrastructure of carp epithelioma cells [J]. *Journal of Jiangxi Agricultural University*), 2020, 42(4): 748-54.
 - [28] 隗黎丽, 刘瑜, 吴华东, 等. MC-LR对草鱼肠道显微结构和炎症相关细胞因子表达的影响[J]. *环境科学学报*(WEI L L, LIU Y, WU H D, et al. Effect of MC-LR on intestinal microstructure and expression of inflammatory cytokines in grass carp [J]. *Journal of Environmental Science*), 2018, 38(2): 829-36.
 - [29] 曹清晟, 王丽萍, 杨辉, 等. 低剂量微囊藻毒素MC-LR诱导罗氏沼虾肝胰腺损伤及凋亡[J]. *生态毒理学报*(CAO Q S, WANG L P, YANG H, et al. Low-dose microcystin MC-LR induced hepatopancreatic injury and apoptosis in *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Journal of Ecotoxicology*), 2020, 15(2): 171-9.
 - [30] LIU L, ZHOU Q B, LIN C G, et al. Histological alterations, oxidative stress, and inflammatory response in the liver of swamp eel (*Monopterus albus*) acutely exposed to copper [J]. *Fish Physiol Biochem*, 2021, 47(6): 1865-78.
 - [31] 刁骋, 韦星呈, 刘新, 等. MRL小鼠*IL-10R1*对B淋巴细胞功能影响的研究[J]. *中国免疫学杂志*(DIAO C, WEI X C, LIU X, et al. Study on the effect of IL-10R1 on the function of B lymphocytes in MRL mice [J]. *Chinese Journal of Immunology*), 2014, 30(3): 323-5,9.

- [32] PENG H, LIU C Y, ZHOU M, et al. IL-10RB ~2834167 (A/G) polymorphism is associated with the susceptibility to systemic lupus erythematosus: evidence from a study in Chinese Han population [J]. *Inflammation*, 2013, 7(11): 145-51.
- [33] HE W, WANG X Y, ZHANG A Y, et al. Identification of grass carp IL-10 receptor subunits: functional evidence for IL-10 signaling in teleost immunity [J]. *Dev Comp Immunol*, 2014, 45: 259-68.
- [34] LU Z J, ZHAN F B, YANG M X, et al. The immune function of heme oxygenase-1 from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) in response to bacterial infection [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2021, 112: 168-78.
- [35] 付春雪, 刘其根, 贾沛轩, 等. 腹腔注射微囊藻毒素-LR对鲢鱼肝脏*HO-1*和*IL-10R1*基因表达的影响[J]. 基因组学与应用生物学(FU C X, LIU Q G, JIA P X, et al. Effect of intraperitoneal injection of microcystin-LR on the expression of *HO-1* and *IL-10R1* genes in silver carp liver [J]. *Genomics and Applied Biology*), 2017, 36(1): 176-82.