

# 鲢鱼、鳙鱼、草鱼谷胱甘肽过氧化物酶 cDNA 的克隆及肝组织表达

何珊 梁旭方\* 廖婉琴 姚伟 李光照 朱伟峰

(暨南大学生命科学技术学院 广州 510632)

**摘要** :利用 RT-PCR 技术分别从淡水食毒藻鱼类鲢鱼(*Hypophthalmichthys molitrix*)、鳙鱼(*Aristichthys nobilis*)及草食性鱼类草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)肝组织扩增出谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)cDNA 核心序列。序列分析表明鲢鱼、鳙鱼、草鱼 GPX 的 cDNA 序列均为 263 bp,编码 87 个氨基酸。鲢鱼、鳙鱼、草鱼与斑马鱼(*Danio rerio*)(同属鲤科)、条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)(鲈形目)等鱼类 GPX 氨基酸序列同源性很高,为 75%~93%;与人(*Homo sapiens*)、小鼠(*Mus musculus*)、大鼠(*Rattus norvegicus*)、猪(*Sus scrofa*)、牛(*Bos taurus*)等哺乳动物 GPX 氨基酸序列的同源性也较高,为 76%~79%。以  $\beta$ -肌动蛋白为内参照,比较鲢鱼、鳙鱼、草鱼肝组织 GPX cDNA 的表达水平,鲢鱼、鳙鱼肝组织 GPX 的表达量远高于草鱼肝的 GPX 表达量,这与鲢鱼、鳙鱼大量摄入微囊藻毒素在鱼体内引发生产生过量的脂过氧化物相适应。

**关键词** :谷胱甘肽过氧化物酶;cDNA 表达;食性;去毒

中图分类号:Q786 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2007)03-40-08

## Molecular Cloning and Tissue Expression of Glutathione Peroxidase cDNA in *Hypophthalmichthys molitrix*, *Aristichthys nobilis* and *Ctenopharyngodon idella*

HE Shan LIANG Xu-Fang\* LIAO Wan-Qin YAO Wei LI Guang-Zhao ZHU Wei-Feng

(College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**Abstract** :Glutathione peroxidase (GPX) cDNAs were cloned from the livers of phytoplanktivorous freshwater fish, *Hypophthalmichthys molitrix*, *Aristichthys nobilis*, and herbivorous fish, *Ctenopharyngodon idella* using RT-PCR. Sequence analysis revealed that the cloned GPX cDNA fragments were all 263 bp in length, encoding 87 amino acids. Search results of the BLAST protein database revealed that the deduced amino acid sequences of Silver Carp, Bighead Carp and Grass Carp GPX were highly (75%–93%) homologous with those of other vertebrates (including *Danio rerio*, *Oplegnathus fasciatus*, *Oncorhynchus mykiss*, human, mouse, rat, pig and cow). Using beta-actin as control, it was showed that the GPX expression in livers from three freshwater fish species had a close relationship with their food habit, and that the expression in phytoplanktivorous fish (Silver Carp and Bighead Carp) is stronger than that in

基金项目 国家自然科学基金(No. 30670367),广东省科技计划(No. 2005B20301005),教育部留学回国人员科研启动基金,广东省自然科学基金(No. 031886)项目;

\* 通讯作者, E-mail: liangxf@jnu.edu.cn;

第一作者介绍 何珊,女,学士,研究方向:基因分子生物学, E-mail: laile1985@163.com.

收稿日期:2006-09-30,修回日期:2007-03-05

herbivorous fish (Grass Carp), suggesting that liver GPX might be important for fish to reduce lipid peroxides which are induced by microcystins.

**Key words** Glutathione peroxidase; cDNA; Expression; Food habit; Detoxification

谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GPX) 是生物体内抗氧化防御系统的重要组成部分, 它可以消除机体内的过氧化氢及脂质过氧化物, 阻断活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS) 对机体的进一步损伤, 是生物体内重要的活性氧自由基清除剂。GPX 根据其亚细胞定位、氨基酸序列不同以及结合底物的特异性, 可分为几种不同的同工酶<sup>[1,2]</sup>, 而根据 GPX 包含的硒代半胱氨酸 (selenocysteine, SeC) 不同, 又可简单分为含硒和不含硒两大类。

随着水体富营养化加剧, 有毒水华对水环境的危害和生物安全日益引起广泛的关注。在已发现的各种藻毒素中, 微囊藻毒素 (microcystin, MC) 是一类在蓝藻水华中出现频率最高、造成危害最严重的藻毒素。MC 是一组环状七肽<sup>[3]</sup>的肝毒素, 这种毒素是肝癌的强烈促癌剂, 可引起鱼类等野生动物因肝损伤、肝内出血甚至肝坏死而中毒死亡<sup>[4,5]</sup>。但某些鱼类 (如鲢鱼、罗非鱼等) 对微囊藻毒素有抗性, 并产生生理上及行为上的适应性, 其去毒分子机理已成为该领域的研究热点<sup>[6~8]</sup>。最新研究表明 GPX 在微囊藻毒素去毒过程中也扮演着重要的角色<sup>[8~10]</sup>。鲢鱼 (*Hypophthalmichthys molitrix*)、鳙鱼 (*Aristichthys nobilis*)、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 为淡水主养鱼类, 这三种鱼类处于水体的不同层次, 食性不一, 因此它们接触微囊藻毒素的几率亦不同, 从而也进化出不同的耐受能力。鲢鱼、鳙鱼、草鱼等淡水鱼类中 GPX 基因 cDNA 核心片段的克隆与分子进化分析, 以及 GPX 基因在这几种鱼类肝组织中表达情况的研究, 将为深入探讨鱼类微囊藻毒素去毒相关基因的表达调控机制, 阐述生态系统中微囊藻毒素去毒代谢的分子机理提供新信息。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验鱼** 鲢鱼、鳙鱼、草鱼均捕捉于博罗县显岗水库及附近水域。

**1.1.2 试剂** 总 RNA 提取试剂盒 SV Total RNA Isolation System 为 Promega 公司产品, RNA 反转录试剂盒 TaKaRa RNA LA PCR™ Kit (AMV) Ver. 1.1、载体 pMD 18-T Vector、Taq DNA 聚合酶为大连宝生物工程有限公司产品, 凝胶产物回收纯化试剂盒 H. Q. & Q. Gel Extraction Kit II (U-gene), 其他试剂均为进口分装或者国产分析纯试剂。大肠杆菌 JM109 由本实验室保存。

### 1.2 方法

**1.2.1 总 RNA 提取和 cDNA 第一链的合成** 分别从鲢鱼、鳙鱼、草鱼分离肝组织, 总 RNA 的提取与纯化按 Promega 公司的 SV Total RNA Isolation System 试剂盒推荐方法进行。cDNA 第一链的合成使用 TaKaRa RNA LA PCR™ Kit (AMV) Ver. 1.1 试剂盒, 分别以鲢鱼、鳙鱼、草鱼总 RNA 为模板, oligo (dT) 18 为反转录引物, 操作按试剂盒推荐方法进行。

**1.2.2 GPX cDNA 序列的克隆** 根据脊椎动物 GPX 氨基酸序列的保守区域设计一对简并引物: GPX01F (5'-GGACATCAGGAGAACTGCAAG-AACGA-3') 和 GPX02R (5'-ACCAGGAAGTCTC-GAAGTTCCA-3')。分别以鲢鱼、鳙鱼、草鱼肝 cDNA 为模板, GPX01F、GPX02R 为引物进行 PCR 反应。PCR 扩增条件均为: 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 60 s, 40℃ 60 s, 72℃ 60 s, 共 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 5 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖电泳检测, 纯化回收后克隆至 pMD 18-T 载体, 转化感受态细胞 *E. coli* JM109, 利用 M13 正反向引物, 通过 PCR 反应检测得到阳性克隆, 阳性克隆由上海英骏生物技术有限公司进行测序。

**1.2.3 序列分析与系统树的构建** 应用 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 软件及

DNA 分析软件 Vector NTI suite 6.0 进行序列分析。采用 Clustal X 1.81 软件进行序列比对排序后,用 Mega 3 软件采用邻接法(NJ method)构建系统树,1 000 次重复计算 bootstrap 值。同源性分析所用序列:斑马鱼 AY216589,条石鲷 AY734530,虹鳟 AF281338,猪 AF532927,牛 NM\_174076,大鼠 NM\_030826,小鼠 BC086649,人 AY327818。

**1.2.4 鲢鱼、鳙鱼、草鱼肝组织 GPX 基因 mRNA 水平的测定** 用 RT-PCR 方法比较鲢鱼、鳙鱼、草鱼肝组织 GPX 的 mRNA 水平,以  $\beta$ -肌动蛋白为内参照。总 RNA 提取和 cDNA 合成同前所述。

根据克隆得到的鲢鱼、鳙鱼、草鱼肝组织 GPX 基因 cDNA 核心片段设计特异引物 GPX03F (5'-AGTCTCTGAAGTACGTCC-3')、GPX04F (5'-AATCTCTGAAGTATGTCCG-3')、GPX05R (5'-GATGTCAATTCCTGTTCAC-3')。以 GPX03F 和 GPX05R 引物分别扩增鲢鱼、鳙鱼肝组织 GPX 基因 cDNA 片段(200 bp);以 GPX04F 和 GPX05R 引物扩增草鱼肝组织 GPX 基因 cDNA 片段(200 bp)。用共同特异引物 ACT01F (5'-CGTGACATCAAGGAGAAGC-3')与 ACT02R (5'-TCTGCTGGAAGGTGGACAG-3')分别扩增鲢鱼、鳙鱼、草鱼  $\beta$ -肌动蛋白 cDNA 片段(436 bp)。

PCR 反应条件为:94℃ 预变性 3 min;94℃ 60 s,55℃ 60 s,72℃ 60 s,共 30 个循环;最后 72℃ 延伸 5 min,指数增长长期内终止反应。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳和溴化乙锭染色后用凝胶成像系统及相关软件进行分析(Alphalmager™,Alpha innotech,USA),结果以 GPX 与  $\beta$ -肌动蛋白 mRNA 的 RT-PCR 产物条带亮度之比(%)表示。

**1.2.5 统计分析** 应用统计分析软件 SPSS 10.0 的单变量分析(post hoc test)对鲢鱼、鳙鱼、草鱼肝组织 GPX 相对表达水平平均值差异进行统计分析。若  $P < 0.05$ ,平均值的差异即认为是显著的。结果以  $\text{Mean} \pm \text{SD}$  (5 尾实验鱼的统计结果, $n = 5$ )表示。

2 结 果

**2.1 GPX cDNA 序列的克隆及分析** 分别以鲢鱼、鳙鱼、草鱼肝组织 cDNA 为模板,用 GPX01F 和 GPX02R 简并引物进行 PCR 扩增,得到 3 个预期片段大小的 PCR 产物。将 PCR 产物电泳纯化、回收后克隆至 pMD 18-T 载体。利用 M13 正反向引物检测得到阳性克隆。对鲢鱼、鳙鱼、草鱼 GPX 基因 cDNA 阳性克隆进行测序,结果显示克隆得到的 GPX cDNA 片段均为 263 bp,均编码 87 个氨基酸(图 1)。将鲢鱼、鳙鱼、草鱼 GPX 的氨基酸序列进行 BLAST 分析表明,鲢鱼、鳙鱼、草鱼与斑马鱼、条石鲷、虹鳟等鱼类 GPX 氨基酸的同源性很高,为 75% ~ 93%(表 1);与人、小鼠、大鼠、猪、牛 GPX 氨基酸序列同源性也较高,为 76% ~ 79%(表 1)。

表 1 鲢鱼、鳙鱼、草鱼与其他物种 GPX cDNA 的氨基酸序列同源性比较(%)

Table 1 Homologies of deduced amino acid sequences of GPX cDNAs of Silver Carp ,Bighead Carp ,Grass Carp and other species

	鲢鱼 <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	鳙鱼 <i>Aristichthys nobilis</i>	草鱼 <i>Ctenopharyngodon idella</i>
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	89	93	92
条石鲷 <i>Oplegnathus fasciatus</i>	82	85	85
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	75	77	77
猪 <i>Sus scrofa</i>	78	79	79
牛 <i>Bos Taurus</i>	76	77	77
大鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	77	77	77
小鼠 <i>Mus musculus</i>	77	78	78
人 <i>Homo sapiens</i>	76	77	77

**2.2 肝 GPX cDNA 的表达** 以  $\beta$ -肌动蛋白为内参照,应用 RT-PCR 技术分析鲢鱼、鳙鱼、草鱼肝 GPX cDNA 的表达差异(图 2)。结果表明,鲢鱼、鳙鱼、草鱼肝 GPX cDNA 的表达水平与这三种鱼类的食性存在明显的相关性,肝 GPX 基因的表达量,滤食性鱼类鲢鱼和鳙鱼显著高于草食性鱼类草鱼(表 2)。

鲢鱼(Silver carp)	GGACATCAGGAGAACTGCAAGAATGAAGAAATTCTGAAGTCTCTGAAGTACGTCCGACCG	60
鳙鱼(Bighead carp)	-----A-----G-----	60
草鱼(Grass carp)	-----G-C-G-----A-----T-----T-----	60
鲢鱼(Silver carp)	G H Q E N C K N E E I L K S L K Y V R P	20
鳙鱼(Bighead carp)	- -	20
草鱼(Grass carp)	- -	20
鲢鱼(Silver carp)	GGAGATGGCTTCGAGCCCAATCCCAGCTTCTGGAGAAGCTTGAAGTGAACGGTGAGAAC	120
鳙鱼(Bighead carp)	---A-----T-----	120
草鱼(Grass carp)	---A-----T-----G-----T-----	120
鲢鱼(Silver carp)	G D G F E P K S Q L L E K L E V N G E N	40
鳙鱼(Bighead carp)	- N - - - - - F - - - - - - - - - - - - - -	40
草鱼(Grass carp)	- N - - - - - F - - - - - - - - - - - - - -	40
鲢鱼(Silver carp)	GCCCACCCCTCTGTTTGTGTTCTTGAAAGAGAAGCTGCCTCAACCCAGTGACGACGCTGTG	180
鳙鱼(Bighead carp)	-----C-----	180
草鱼(Grass carp)	-----C-----T-----	180
鲢鱼(Grass carp)	A H P L F V F L K E K L P Q P S D D A V	60
鲢鱼(Silver carp)	- -	60
草鱼(Grass carp)	- -	60
鲢鱼(Silver carp)	TCCCTGATGGGTGATCCCAAATTCATCATCTGGAGTCCCGTGAACAGGAATGACATCGCC	240
鳙鱼(Bighead carp)	-----G-----	240
草鱼(Grass carp)	-----	240
鲢鱼(Silver carp)	S L M G D P K F I I W S P V N R N D I A	80
鳙鱼(Bighead carp)	- -	80
草鱼(Grass carp)	- -	80
鲢鱼(Silver carp)	TGGAATTTTGAAAAGTTCCTGGT	263
鳙鱼(Bighead carp)	-----C-G-----	263
草鱼(Grass carp)	-----C-----	263
鲢鱼(Silver carp)	W N F E K F L	87
鳙鱼(Bighead carp)	- - - - - - -	87
草鱼(Grass carp)	- - - - - - -	87

图 1 鲢鱼、鳙鱼、草鱼 GPX cDNA 核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig.1 Nucleotide sequences and deduced amino acid sequences of Silver Carp ,Bighead Carp and Grass Carp GPX cDNAs

“ - ”代表相同的核苷酸或氨基酸。Dashes represent the nucleotide and amino acid identity.

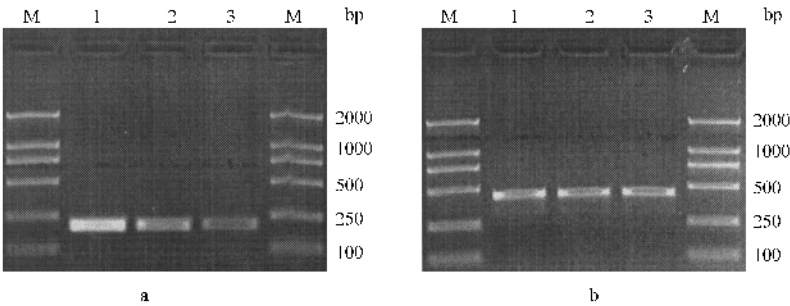


图 2 鲢鱼、鳙鱼、草鱼肝 GPX 基因 mRNA 的 RT-PCR 分析

Fig.2 Analysis of GPX mRNA expression among Silver Carp ,Bighead Carp and Grass Carp by RT-PCR

M. DNA 分子量标记 DL2000 ;1. 鲢鱼 ;2. 鳙鱼 ;3. 草鱼 ;a : GPX ;b : β-肌动蛋白。

M. DNA marker DL2000 ;1. Silver Carp ;2. Bighead Carp ;3. Grass Carp ;a : GPX ;b : β-actin.

表 2 鲢鱼、鳙鱼、草鱼肝 GPX 基因的表达  
Table 2 GPX gene expression in liver of  
Silver Carp ,Bighead Carp and Grass Carp

种类 Species	Ratio GPX/ $\beta$ -actin mRNA ( % )
鲢鱼 <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	200.04 $\pm$ 30.5 <sup>a</sup>
鳙鱼 <i>Aristichthys nobilis</i>	188.1 $\pm$ 16.6 <sup>a</sup>
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idella</i>	102.02 $\pm$ 13.5 <sup>b</sup>

不同上标字母表示差异显著(  $P < 0.05$  )  
Different superscripts indicate significant difference(  $P < 0.05$  ).

3 分析与讨论

3.1 不同物种 GPX 基因 cDNA 序列分析

GPX 是一个多酶家族的统称 ,其中一部分酶有依赖硒的谷胱甘肽过氧化物酶活性并含有独特的 UGA 编码的硒代半胱氨酸( SeC ),简称 Se-GPX ,而另外一部分酶则不含 SeC。根据 Se-GPX 分布和催化底物的不同 ,脊椎动物体内的 Se-GPX 分为 4 个亚型 ,即典型谷胱甘肽过氧化物酶 ( classical GPX ,GPX-1 ) 胃肠型谷胱甘肽过氧化物酶 ( gastrointestinal GPX ,GPX-2 ) 血浆型谷胱甘肽过氧化物酶 ( plasma GPX ,GPX-3 ) 和磷脂氢谷胱甘肽过氧化物酶( phospholipid-hydroperoxide GPX ,PHGPX ,GPX-4 )<sup>[2]</sup>。BLAST 结果表明本研究克隆得到的鲢鱼、鳙鱼、草鱼 GPX 序列与哺乳动物大鼠、小鼠、牛、人等的 GPX-1 基因同源性较高 ,均为 80% 左右 ,而与哺乳动物其他亚型同源性低 ,因此认为我们克隆得到的鲢鱼、鳙鱼、草鱼 GPX 基因也属 GPX-1 亚型。

哺乳动物完整的 GPX-1 由 201 ~ 206 个氨基酸组成 ,而斑马鱼和条石鲷完整的 GPX-1 均由 191 个氨基酸组成 ,而我们克隆得到的鲢鱼、鳙鱼、草鱼 GPX 基因则相当于斑马鱼或条石鲷 GPX 基因第 73 位到第 159 位氨基酸残基组成的片段。与哺乳动物 GPX-1 基因类似 ,鱼类 GPX-1 均含有位于 N-端由 UGA 编码的 SeC 位点。哺乳动物中 ,SeC 与硒结合位点 Gln82 和 Trp160 通过氢键结合<sup>[11]</sup> ,而在鲢鱼、鳙鱼、草鱼 GPX 基因中也存在相应的硒结合位点 Gln3 和 Trp81 ,相当于斑马鱼或条石鲷的 Gln75 和

Trp153。哺乳动物中 Arg52、98、179、180 和 Lys86 等残基在传递底物至催化中心过程中起重要作用<sup>[12]</sup> ,而这些位点在鲢鱼、鳙鱼、草鱼等鱼类中均很保守( 图 3 )。

GPX 酶蛋白均包含有 3 个环结构 ,其氨基酸序列在所有物种的所有亚型中均高度保守。哺乳动物中 ,第一个环结构是 Asn42-Tyr54 ( NVASLUGTTVRDYT ) ,第二个环结构是 Leu72-Gln82 ( LGFPCNQFGHQ ) ,第三个环结构是 Trp160-Phe162 ( WNF )。这三个环结构起到稳定酶三级结构的作用<sup>[13]</sup>。鲢鱼、鳙鱼、草鱼等鱼类 GPX 的 3 个环结构序列也十分保守( 图 3 )。

哺乳动物中 ,除含有 SeC 的 4 个亚型外 ( GPX-1 ,2 ,3 ,4 ) ,还包括了不含有 SeC 的 2 个亚型( GPX-5 ,7 )。最近在人类中发现另一个硒依赖蛋白 GPX6 ,但在大鼠、小鼠中发现的 GPX6 则不含 SeC。将推测的鲢鱼、鳙鱼、草鱼 GPX 氨基酸序列和哺乳动物 7 种亚型 GPX 全部氨基酸序列一起构建系统树( 图 4 )。结果显示哺乳类不同亚型 GPX 基本上独立占据了进化树上的不同分支 ,较为特殊的是 GPX-3、GPX-5 和 GPX-6 ,这三种亚型的 GPX 分别处于同一分支上的不同小分支 ,说明这三个亚型的 GPX 可能来源于一个共同祖先。而鲢鱼、鳙鱼、草鱼与斑马鱼 GPX 形成一个独立的分化群 ,并与哺乳类 GPX-1 处于同一个进化树分支 ,因此进一步确定所克隆鲢鱼、鳙鱼、草鱼 GPX 属于 GPX-1 亚型。

3.2 鲢鱼、鳙鱼、草鱼肝组织 GPX 基因 cDNA

表达差异比较 鲢鱼、鳙鱼、草鱼分别处于水体的不同层次 ,食性也不同。鲢鱼生活在水体的中上层 ,为典型滤食性鱼类 ,食物以浮游植物为主 ,鳙鱼生活在水体中层 ,滤食性 ,主要以轮虫、枝角类、桡足类等浮游动物为食 ,也食用部分浮游植物。鲢鱼、鳙鱼均适于在富营养化水体生活 ,因此它们接触到微囊藻毒素的几率、浓度均较大 ,长期的自然选择必然会使它们对微囊藻毒素的耐受性得到很大的提高 ,因此它们对微囊藻毒素的耐受能力也会相应增强。利用鲢、

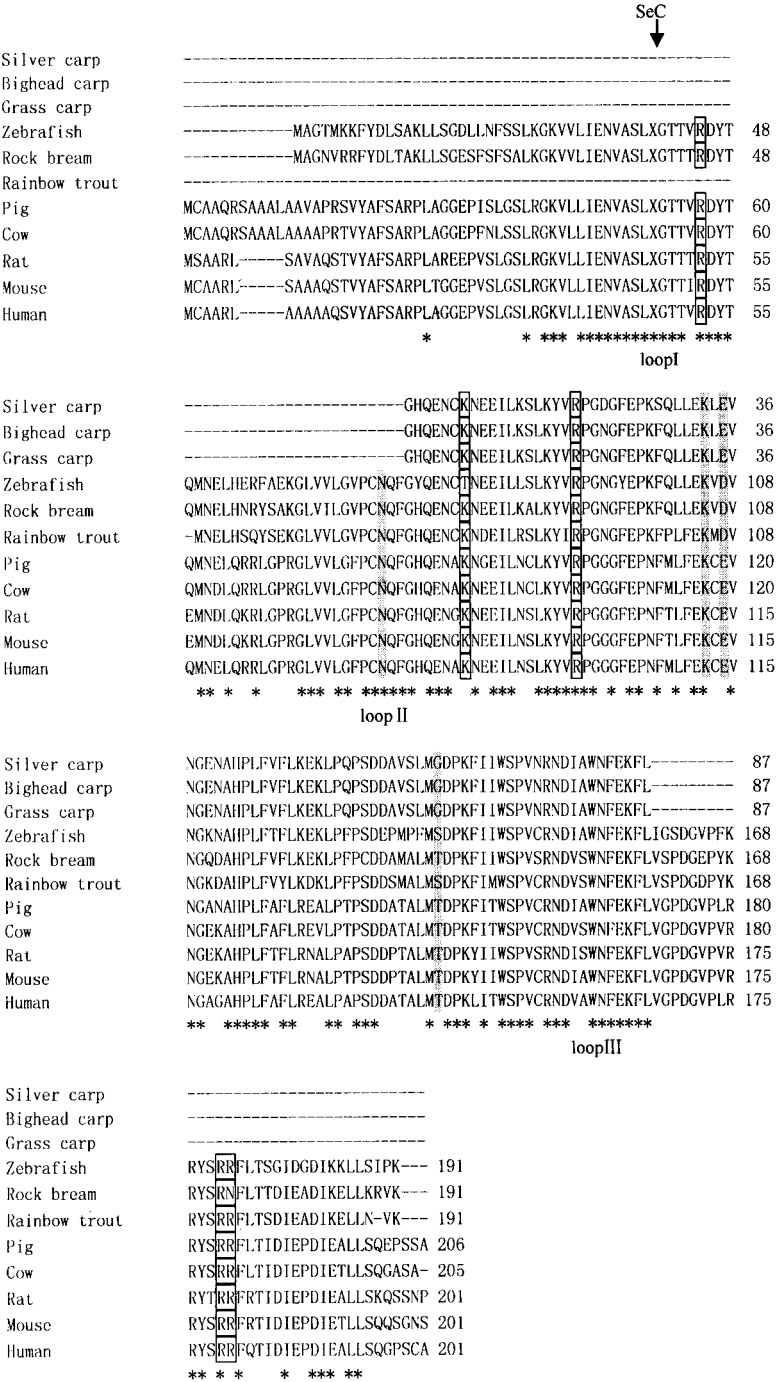


图 3 鲢鱼、鳙鱼、草鱼 GPX 与其他脊椎动物 GPX 的氨基酸序列比较及结构分析

Fig.3 Comparison of the GPX amino acid sequences among Silver Carp , Bighead Carp ,Grass Carp and other vertebrates

“ - ”表示比较时必要的氨基酸缺口；“ \* ”表示保守的氨基酸残基；“ X ”代表 UGA 编码的硒代半胱氨酸位点。黑体代表硒的结合位点，方框代表传递底物至催化中心中起重要作用的氨基酸，阴影代表活性必需的氨基酸，有助于稳定酶立体结构的 3 个环结构用粗下划线表示。

Dashes indicate the amino acid gaps which are necessary to align these sequences. “ \* ” indicates the same residue in all sequences. “ X ” indicates the residue of selenocysteine. The active-site residues located within hydrogen-bonding distances to the selenium atoms are boldfaced. Residues directing the substrates toward the catalytic centers are boxed. Residues that are necessary for the activity of the enzyme are darkened. Three loop structures that stabilize the structure of the enzyme are underlined.

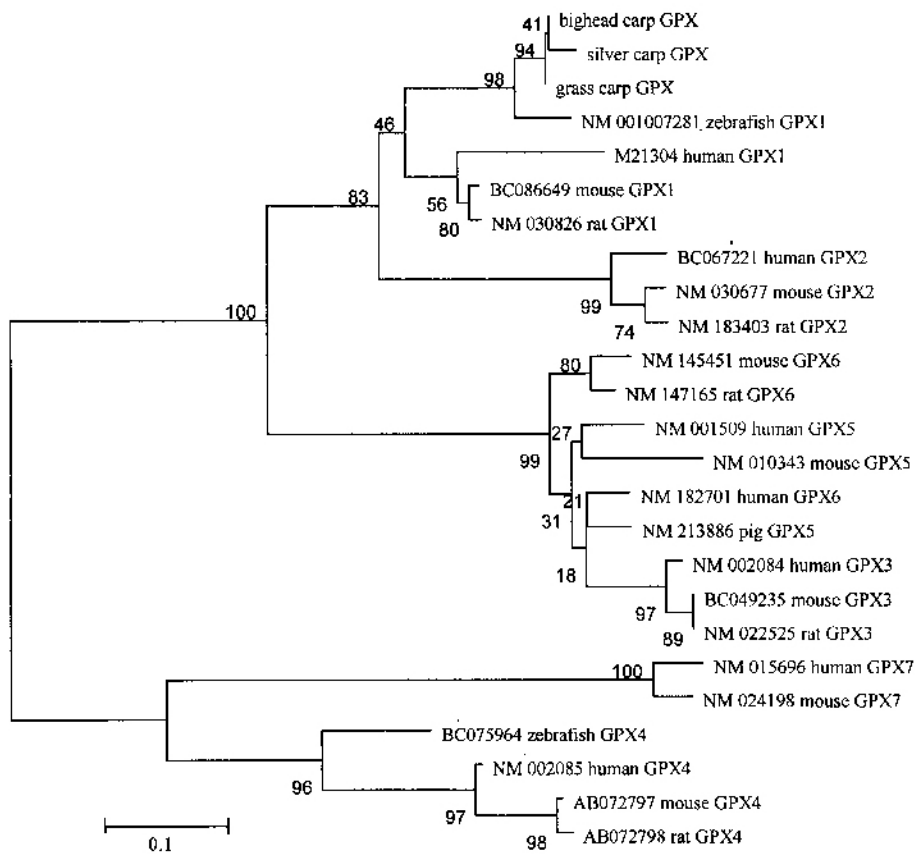


图 4 鲢鱼、鳙鱼、草鱼与哺乳动物不同类型 GPX 氨基酸序列构建的系统树

Fig.4 Phylogenetic tree inferred from GPX amino acid sequences of

Silver Carp ,Bighead Carp ,Grass Carp and various classes of mammalian GPX

编号代表 GenBank 序列号 ; Clustal X 1.81 软件进行序列的对位排列 , Mega 3 软件中的 NJ 法建树 , 500 次重复计算 bootstrap 值 , 比例尺 = 0.1 , 表示物种间的进化距离。

The number stands for GenBank accession number ; Amino acid sequence alignment was carried out by Clustal X 1.81. The consensus tree was constructed by neighbor-joining bootstrap using Mega 3. Numbers are the bootstrap values for 500 trials ; Bar = 0.1 , the bar indicates the evolutionary distance between the groups .

鳙控制藻类、改善水质的生态作用已为国内外其他大量实验研究所证实<sup>[14~16]</sup>。草鱼通常栖息于水体的中下层或靠水草多的地方 , 是比较典型的草食性鱼类 , 因此其接触微囊藻毒素的几率很小。以  $\beta$ -肌动蛋白为内参照 , 应用 RT-PCR 比较鲢鱼、鳙鱼、草鱼肝组织 GPX cDNA 的表达水平发现 , 鲢鱼、鳙鱼肝 GPX 的表达量远高于草鱼肝 GPX 的表达量 , 这与鲢鱼、鳙鱼大量摄入微囊藻毒素 , 在鱼体内引发产生过量

的脂过氧化物相适应。

肝是动物脂肪酸  $\beta$ -氧化代谢的重要部位 , 同时又是微囊藻毒素的致毒靶器官<sup>[17]</sup>。微囊藻毒素进入肝细胞后 , 可引起细胞中产生大量的  $O_2^-$ 、 $H_2O_2$  等活性氧分子<sup>[18,19]</sup>。这些活性氧分子不但直接造成细胞损伤 , 引起血浆中乳酸脱氢酶 (LDH) 及丙氨酸转氨酶 (ALT) 含量升高 , 还将大量脂质分子氧化为过氧化脂质 (ROOH)<sup>[10,20]</sup>。脂质分子是生物膜的重要组成

部分,脂质过氧化会影响细胞膜的功能与结构,并最终危及机体正常的生命活动。GPX 作为生物体内主要的抗氧化酶之一,在保护细胞膜免受过氧化损伤中有着特殊的意义。GPX 通过还原性谷胱甘肽催化还原过氧化物和有机过氧化物,中和脂质过氧化物 (ROOH) 和氢过氧化物 ( $H_2O_2$ ),从而保护细胞和其他如 DNA、蛋白及脂质体等敏感生物分子免受氧自由基的损伤。因此 GPX 在微囊藻毒素去毒过程中扮演了重要的角色,这一观点已得到大量的实验支持。例如, Gehring 等<sup>[9]</sup>研究证实,给予小鼠一定剂量的微囊藻毒素 8 h 后,GPX 活性增加,同时也伴随着相应基因转录表达的增强。Jos 等<sup>[8]</sup>以蓝藻细胞喂饲罗非鱼 (*Oreochromis* sp.) 实验亦发现,实验组罗非鱼 GPX 活性在整个喂养期间均高于对照组,这与 Li 等<sup>[21]</sup>用 MC 处理培养的鲤 (*Cyprinus carpio*) 肝细胞的结果相类似。因此,我们认为鲢鱼、鳙鱼对微囊藻毒素的强耐受能力,很可能与抗氧化基因的表达水平有关。

目前,有关 GPX 的精细结构、顺式元件与反式因子及其作用机理尚未明了。是否可以在食物中添加特定的物质(如生物硒等),以增强淡水鱼类等抗氧化基因的表达,减轻急性或长期接触导致的慢性致毒作用,是否可以从基因水平上定向筛选高效去毒的淡水鱼类品系(例如鲢鱼、鳙鱼等),以通过非经典生物操纵更为有效地直接消除微囊藻毒素,这些都有待于进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] Ursini F, Miaorino M, Brigelius-Flohe L, et al. Diversity of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*, 1995, **252**: 38 ~ 53.
- [2] Arthur J R. The glutathione peroxidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2000, **57**: 1 825 ~ 1 835.
- [3] Carmichael W W. The toxins of cyanobacteria. *Sci Am*, 1994, **270**: 64 ~ 72.
- [4] Codd G A. Cynobacterial toxins: occurrence, properties and biological significance. *Water Sci Technol*, 1995, **32**: 149 ~ 156.
- [5] Dawson R M. The toxicology of microcystins. *Toxicon*, 1998, **36** (7): 953 ~ 962.
- [6] 何家菀, 何振荣, 郭琼林. 有毒铜绿微囊藻对鱼和溞的毒性. *湖泊科学*, 1997, **9** (1): 49 ~ 56.
- [7] Xie L Q, Xie P, Ozawa K, et al. Dynamics of microcystins-LR and -RR in the phytoplanktivorous silver carp in a sub-chronic toxicity experiment. *Environ Pollut*, 2004, **127** (3): 431 ~ 439.
- [8] Jos Á, Pichardo S, Prieto A I, et al. Toxic cyanobacterial cells containing microcystins induce oxidative stress in exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.) under laboratory conditions. *Aquat Toxicol*, 2005, **72**: 261 ~ 271.
- [9] Gehring M M, Shephard E G, Downing T G, et al. An investigation into the detoxification of microcystin-LR by the glutathione pathway in Balb/c mice. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, **36** (5): 931 ~ 41.
- [10] Cazenave J, Bistoni M de L, Pesce S F, et al. Differential detoxification and antioxidant response in diverse organs of *Corydoras paleatus* experimentally exposed to microcystin-RR. *Aquat Toxicol*, 2006, **76** (1): 1 ~ 12.
- [11] Epp O, Ladenstein R, Wendel A. The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution. *Eur J Biochem*, 1983, **133**: 51 ~ 69.
- [12] Aumann K D, Bedorf N, Brigelius-Flohe R, et al. Glutathione peroxidases revisited-simulation of the catalytic cycle by computer-assisted molecular modeling. *Biomed Environ Sci*, 1997, **10**: 136 ~ 155.
- [13] Fukuhara & Kageyama T. Structure, gene expression, and evolution of primate glutathione peroxidases. *Comp Biochem Physiol Part B*, 2005, **141**: 428 ~ 436.
- [14] Datta S, Jana B B. Control of bloom in a tropical lake: grazing efficiency of some herbivorous fishes. *J Fish Biol*, 1998, **53** (1): 12 ~ 24.
- [15] Xie P, Liu J K. 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. *Scientific World Journal*, 2001, **1**: 337 ~ 356.
- [16] 刘建康, 谢平. 用鲢鳙直接控制微囊藻水华的围隔试验和湖泊实践. *生态科学*, 2003, **22** (3): 193 ~ 196.
- [17] Eriksson J E, Meriluoto J A, Kujari H P, et al. Preliminary characterization of a toxin isolated from the cyanobacterium *Nodularia spumigena*. *Toxicon*, 1988, **26**: 161 ~ 166.
- [18] Ding W X, Shen H M, Ong C N. Critical role of reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition in microcystin-induced rapid apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology*, 2000, **32**: 547 ~ 555.
- [19] Ding W X, Shen H M, Ong C N. Critical role of reactive oxygen species formation in microcystin-induced cytoskeleton disruption in primary cultured hepatocytes. *J Toxicol Environ Health Part A*, 2001, **64** (6): 507 ~ 519.
- [20] Yin L, Huang J, Huang W, et al. Microcystin-RR-induced accumulation of reactive oxygen species and alteration of antioxidant systems in tobacco BY-2 cells. *Toxicon*, 2005, **46** (5): 507 ~ 512.
- [21] Li X, Liu Y, Song L, et al. Responses of antioxidant systems in the hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to the toxicity of microcystin-LR. *Toxicon*, 2003, **42**: 85 ~ 89.