昆明学院学报 2012,34(6):52~54 CN 53-1211/G4 ISSN 1674-5639
Journal of Kunming University

滇池微囊藻毒素对小鼠肾脏的毒性研究

杨黎江,沈 放,路 斌,仝向荣,邱金花,付再伟
(昆明学院 生命科学与技术系,云南 昆明 650214)

摘要:为了探索滇池微囊藻毒素对小鼠肾脏的损伤作用,以滇池水华水样提取微囊藻毒素对小鼠进行连续灌胃,然后取其肾组织石蜡包埋、HE 染色后对小鼠肾脏组织进行显微结构观察.结果显示,小鼠肾脏形态未见明显异常,但肾小管因细胞脱落而结构不完整,细胞间隙有炎症细胞浸润.表明肾脏可能是微囊藻毒素的靶器官,微囊藻毒素通过破坏肾单位的结构,影响其生理功能.

关键词:微囊藻毒素;小鼠肾脏;肾小管;毒性作用;HE 染色
中图分类号:R994.6 **文献标识码**:A **文章编号**:1674-5639(2012)06-0052-03

Study the Toxicity of Microcystin in Water of Dianchi Lake on Mice Kidney

YANG Li-jiang, SHEN Fang, LU Bin, TONG Xiang-rong, QIU Jin-hua, FU Zai-wei
(Department of Life Science and Technology, Kunming University, Yunnan Kunming 650214, China)

Abstract: To study whether Microcystin in Dianchi Lake harms the kidney of mice, mice were intragastrically administered. Microcystin was extracted from Dianchi Lake Water-Blooms samples. Paraffin sections of kidney were stained by HE staining and observed under microscope. It displayed that nephritic modality remained normal; after intragastrically administered Microcystin, the structure of renal corpuscle was damaged, renal tubule was less integrity because of cell loss, severe inflammatory cells infiltration were found in interstitial area. In conclusion, kidney maybe is target organ of Microcystin which destroy nephron structure and affect its physiology.

Key words: microcystin; mice kidney; renal tubule; toxicity; HE-stainin

近年来,由于环境污染导致滇池水体退化而引发水体中蓝藻的异常繁殖.蓝藻、绿藻、硅藻成为滇池藻类的优势种群,其中以蓝藻门中微囊藻属、束丝藻属、颤藻属及绿藻中的衣藻属、转板藻属为主,而微囊藻属的铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)是形成"水华"的优势种[1].蓝藻细胞破裂后向水体中释放的多种藻毒素是造成蓝藻水华污染的主要原因[2].在已发现的各种藻毒素中,微囊藻毒素(Microcystin,MC)是一种在蓝藻水华污染中最易出现、产生数量最多、危害性最严重的藻毒素.已有研究表明,MC 能引发实验动物急性中毒,肝脏是其靶器官[3-4],但对肾脏的影响鲜见报道.

本研究拟通过动物试验,从小鼠肾脏形态及组织病理学观察 MC 对小鼠肾脏造成的损伤,并对其损伤机制进行探讨,为开展藻毒素的生物化学、生态毒理学的研究及寻找有效水华控制途径提供科学参考.

1 材料与方法

1.1 材料

夏、秋季水华爆发期间,于滇池龙门村收集水体中含大量藻团的水样,水样为深绿色,可闻及腥臭味,pH5.6~6.0,鉴定水样藻类,以明确水样中的优势藻类.

1.2 仪器和试剂

生物组织切片机(LEICA RM2235);天平(METTIER XS205DU);恒温培养箱;水浴锅;显微图像分析系统(MOTIC BA300).

梯度酒精;二甲苯;苏木素染液;伊红染液;石蜡(熔点 56~58 ℃);所用试剂均为国产分析纯.

1.3 试验动物

健康昆明种小鼠,购于昆明医科大学实验动物中心(许可证号:2005017),体质量 20~25 g,雌雄不拘,性成熟.试验前,将动物置于室温(20±2)℃的饲养房内,自然状态下生活,自由饮水、进食,适应环境 1 周.

1.4 样品处理

将滇池水华水样过滤,收集藻样并将其反复多次冻融,以改变藻细胞膜通透性,使微囊藻毒素从藻细胞内扩散出来,用醋酸搅提水样藻浆,再经旋转蒸发浓缩获得微囊藻毒素提取液.

1.5 微囊藻毒素提取液的长期毒性试验

选择体质量为 20~25 g 的健康昆明种小鼠,随机分为对照组($n=5$)和微囊藻毒素提取液组($n=10$).试验组每天灌胃微囊藻毒素提取液 0.1 mL,对照组每天灌胃等体积的生理盐水,同时观察小鼠的饮食、行为、外观、排泄物等情况是否有异常,并记录,定时对

收稿日期:2012-09-17
基金项目:云南省教育厅科学研究基金资助项目(09C0133)
作者简介:杨黎江(1969—),女,云南昆明人,副教授,硕士,主要从事生理学和药理学研究.

小鼠进行体质量秤量. 连续灌胃 1 个月后,颈椎脱臼处死小鼠、解剖,暴露肾脏观察其形态并拍照,离体完整肾脏于天平上称其质量,计算肾脏系数,之后取肾组织中性甲醛固定,石蜡包埋,HE 染色.

1.6　小鼠肾脏组织病理切片图像分析

利用 MOTIC BA300 显微图像分析系统,光镜下观察小鼠肾脏组织结构的病理变化情况,描述微囊藻毒素对肾脏毒性作用的组织学表现,结合生理功能分析微囊藻毒素对动物产生毒性作用的机制.

1.7　统计学处理

小鼠肾脏系数用:平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS 13.0 统计分析软件进行统计学分析,$P < 0.05$ 表示有差异有统计学意义.

2　结果与分析

2.1　微囊藻毒素对小鼠肾脏形态的影响

由图 1 可见,经微囊藻毒素浸染后的小鼠肾脏色暗红,表面色泽均匀,肾脏形态未见明显异常.

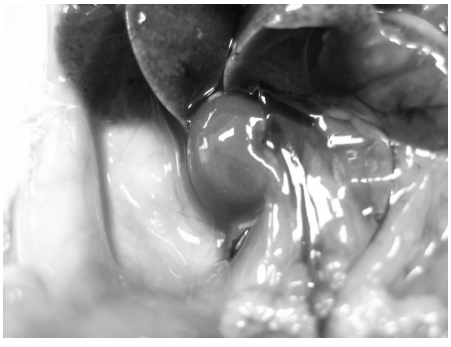


图1　微囊藻毒素对小鼠肾脏形态的影响

2.2　微囊藻毒素对小鼠肾脏系数的影响

小鼠脱臼处死后,解剖暴露肾脏,将其完整离体,于分析天平上称全肾湿质量,按下列公式计算肾脏系数,结果见表 1.

表 1　MC 对小鼠肾脏系数的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	体质量/g	单侧肾脏湿质量/g	肾脏系数/%
对照组	49.350 ± 0.212	0.401 ± 0.004	0.813 ± 0.012
MC 组	40.300 ± 0.458	0.329 ± 0.012	0.863 ± 0.046

肾脏系数/% = (单侧肾脏湿质量/体质量) × 100.

从表 1 可以看出,MC 组小鼠在给予 MC 持续灌胃后,肾脏系数与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$).

2.3　微囊藻毒素对小鼠肾脏组织病理学的影响

图 2 和图 3 是对照组小鼠肾脏经 HE 染色后,在低倍镜下观察可见小鼠肾皮质有许多迂曲的泌尿小管和肾小体(图 2). 在高倍镜下(图 3)清晰可见构成肾小体的血管球和肾小囊腔,肾小球毛细血管袢薄而清楚,肾小囊腔隙均匀,肾小管管壁细胞为锥体形或立方形,核明显,小管横切面轮廓清楚.

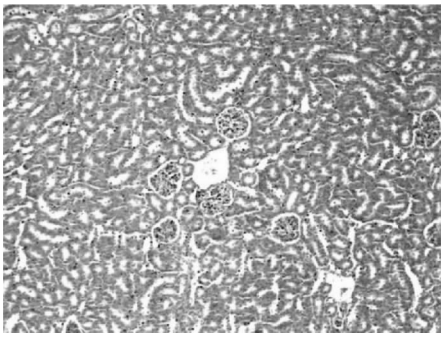


图2　对照组小鼠肾脏HE × 100

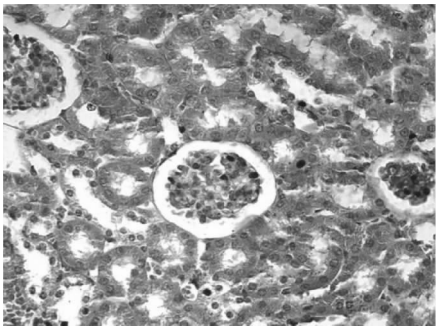
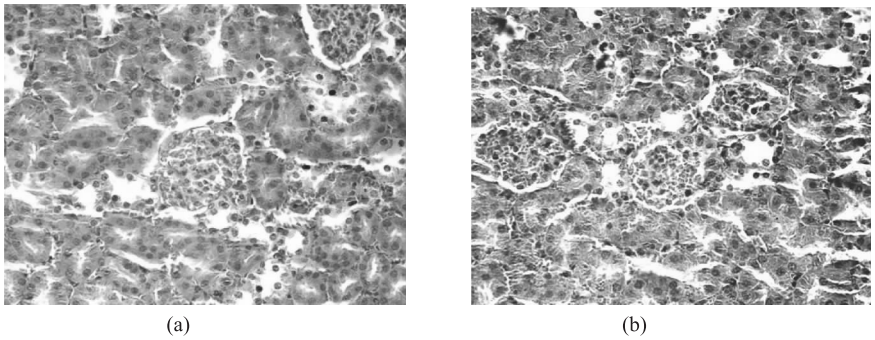


图3　对照组小鼠肾脏HE × 400

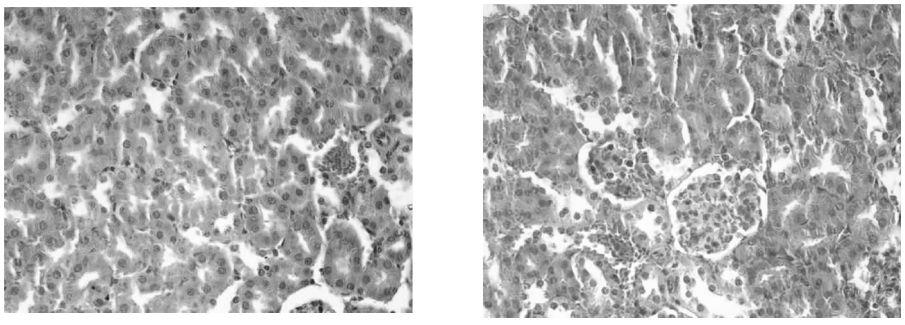
图 4 是 MC 组小鼠肾脏经 HE 染色后,在高倍镜下观察发现,肾小体的毛细血管球体积增大,肾小球内细胞数目明显增多,其中含有大量红细胞,肾小囊脏层结构破坏,肾小球囊腔狭窄或闭塞,使毛细血管球受压,同时伴有炎症细胞浸润. 肾小管管壁的上皮细胞脱落到管腔内,管腔堵塞,细胞间隙内可见炎症细胞浸润.

从下图 5 还可见,经 HE 染色后的 MC 组小鼠肾脏中,近球小管和远球小管管腔狭窄,管壁因细胞脱落而结构不完整,部分管腔内见大量的红细胞.



(a)　(b)

图4　MC组小鼠肾脏HE × 400(示肾小体)



(a) (b)

图5 MC组小鼠肾脏HE×400（示肾小管）

3 讨论

随着城市人口增加和工农业的发展，滇池周边的环境遭受破坏，致使滇池水体富营养化而发生严重的蓝藻水华现象. 目前，滇池“水华”的优势种主要是蓝藻门中微囊藻属的铜绿微囊藻（*Microcystis aeruginosa*）. 藻细胞腐败分解后释放到水体中的微囊藻毒素（MC）因生物及理化性质稳定，不易降解，成为蓝藻水华污染中常见的且危害性最大的藻毒素. 以往研究结果显示，MC 的主要靶器官是肝脏. 随着研究的深入，当动物体内注入 MC 后，除肝脏外，在肾脏中也检测到了较高浓度的 MC，提示 MC 可能造成肾损伤[5]. 肾脏是人体或哺乳动物重要的排泄器官，通过形成尿液，将体内物质的代谢终产物、体内过剩的物质及进入体内的异物排出体外，以维持内环境的平衡和稳定. 肾脏结构一旦遭受破坏将导致机体多种生理功能发生紊乱，进而威胁人和动物的健康.

本研究用微囊藻毒素提取液连续灌胃小鼠，解剖小鼠后与对照组小鼠肾脏相比，浸染毒素的小鼠肾脏从外观上未见明显异常现象，且肾脏系数与对照组相比差异无统计学意义（$P > 0.05$），说明小鼠肾脏没有表现明显的充血、肿胀现象. 采用放射性自显影的研究[6]显示，进入肾脏的 MC 主要集中于肾皮质区域内的肾细胞内. 这些胞内的 MC 通过结合微管蛋白中的半胱氨酸残基，使游离在胞质中的微管蛋白数量增加，影响了微管蛋白 mRNA 的稳定性，抑制微管蛋白的合成，破坏细胞骨架的功能，最终引起细胞形态的改变[7]. 以上原因的共同作用才使我们观察到，经 MC 浸染的小鼠其肾小囊脏层结构异常，肾小球囊腔狭窄或闭塞，肾小管管壁细胞脱落. 由于肾小管受损，原尿中 Na^+ 的重吸收障碍，小管液中因 Na^+ 含量改变引起肾素分泌，通过 RAAS 的作用使入球小动脉收缩而影响肾小球的滤过率. 另一方面，坏死脱落的肾小管上皮细胞可能因阻塞管腔而引起管内压升高，进而逆向引起囊内压的升高，使有效滤过压降低而影响肾小球的滤过作用，机体可能因此而出现少尿，甚至无尿而出现内环境紊乱的现象.

近年的研究还发现，微囊藻毒素不但可以导致细胞死亡，而且还可诱导细胞增殖，而微囊藻毒素的有效浓度成为决定这对矛盾主要方面的关键因素[7]. 在图 4 中所观察到的肾小球内细胞数目明显增多，就可能与肾脏内微囊藻毒素的浓度有关. 因浸入小鼠体内的 MC 主要依靠分布于肝细胞表面的胆酸盐转运系统经循环进入细胞内，所以肾内的微囊藻毒素浓度应该相对低于肝脏，这与文献[8]报道的细胞的增殖主要与低浓度毒素水平相关是一致的.

由于微囊藻毒素的损伤作用导致肾组织的病理变化如肾小管细胞的变形、脱落，毛细血管球破坏及肾小囊脏层结构损伤等. 当局部组织因损伤而引发机体的防御性反应过程中，如 MC 激活补体系统后产生的活性产物 C3a 或 C5a 通过趋化作用引导炎症细胞游走到炎症部位，或其他趋化因子的作用即出现图 4 显示的炎症细胞浸润现象.

综上所述，肾脏可能是微囊藻毒素的一个重要靶器官，MC 通过损伤肾脏细胞的骨架、促进细胞增殖及炎症因子的共同作用造成小鼠肾脏的损伤.

[参考文献]

[1] 吴为樑，林毅雄，刘丽萍，等. 滇池水体中主要藻种毒素研究[J]. 云南环境科学，1997，16(2)：26－29.

[2] KENEFICK S L，HRUDEY S E，PETERSON H G，et al. Toxin release from Microcystis aeruginosa after chemical treatment [J]. Wat Sci Tech，1993，27(3)：433－440.

[3] HEINZE R. Toxicity of the cyanobacterial toxin microcysin-LR to rate after 28 days intake with the drinking water [J]. Environ Toxicol，1999，14：57－60.

[4] FAWELL J K，HART J，JAMES H A，et al. Blue-green algae and their toxins-analysis，toxicity，treatment and environmental control [J]. Wat Supply，1993，11(3)：109－121.

[5] 丁笑生. 微囊藻毒素及其肾毒性的研究进展[J]. 安徽农业科学，2008，36(31)：13506－13507.

[6] 张占英，连民，刘颖，等. 微囊藻毒素 LR 对胎鼠的致畸和损伤作用[J]. 中华医学杂志，2002，82(5)：345－347.

[7] 陈国永. 淡水微囊藻毒素毒理学研究进展[J]. 卫生研究，2006，35(1)：120－122.

[8] GEHRINGER M M. Microcystin-LR and okadaic acid-induced celluar effect：a dualistic response [J]. FEBS Lett，2004，557：1－8.