

微囊藻毒素和脂多糖对鲢鱼和草鱼肝脏去毒 相关基因活体诱导表达的影响

王琳, 梁旭方, 刘秀霞, 程炜轩, 郁颖

(暨南大学生物工程学系, 广东 广州 510632)

[摘要] 采用 $50 \mu\text{g} \cdot (\text{kg 体质量})^{-1}$ 的微囊藻毒素-LR (MC-LR)、 $2 \text{ mg} \cdot (\text{kg 体质量})^{-1}$ 的脂多糖 (LPS) 和 $50 \mu\text{g} \cdot (\text{kg 体质量})^{-1}$ MC-LR + $2 \text{ mg} \cdot (\text{kg 体质量})^{-1}$ LPS 分别活体腹腔注射鲢鱼、草鱼, 采用实时荧光定量 PCR 方法测定 MC-LR 和 LPS 对鲢鱼、草鱼肝脏 α -谷胱甘肽 S-转移酶 (GSTA)、 ρ -谷胱甘肽 S-转移酶 (GSTP)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GPX) 和解偶联蛋白 2 (UCP2) 等去毒相关基因活体诱导表达的影响。结果表明, 鲢鱼、草鱼 GSTA 和 GSTP 的不同诱导变化除与两种淡水鱼类对毒素的耐受性相关外, 还与毒素剂量、诱导时间等因素相关。LPS 对 GSTA 和 GSTP 基因组成型、诱导型的作用不同, 可能与调节因子 LPS 对不同生态习性淡水鱼类肝脏 GST 基因表达水平的调节作用不同有关。UCP2 与 GPX 也分别在抑制过量 ROS 发生方面与肝脏抗氧化胁迫等方面起重要作用。

[关键词] 微囊藻毒素-LR; 脂多糖; 可溶性谷胱甘肽 S-转移酶; 谷胱甘肽过氧化物酶; 解偶联蛋白 2; 诱导表达; 实时荧光定量 PCR; 淡水鱼类

[中图分类号] Q786 [文献标识码] A [文章编号] 1000-9965(2009)01-0111-06

Transcriptional responses of detoxification-related genes in the liver of *Hypophthalmichthys molitrix* and *Ctenopharyngodon idellus* intraperitoneally injected with microcystin-LR and lipopolysaccharide

WANG Lin, LIANG Xu-fang, LIU Xiu-xia, CHENG Wei-xuan, YU Ying

(Department of Biotechnology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

[Abstract] To study the transcriptional response of detoxification-related liver genes to microcystin-LR (MC-LR) and lipopolysaccharide (LPS) treatment, silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) were respectively exposed to a single $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ body weight (bwt) dose of pure MC-LR, a single 2 mg kg^{-1} bwt dose of LPS and a co-exposure MC-LR and LPS ($50 \mu\text{g kg}^{-1}$ bwt + 2 mg kg^{-1} bwt), and were then sacrificed at 24 h post-exposure. Using beta-actin (β -ACT) as external control, the relative liver α - and ρ - class soluble glutathione S-transferase (GSTA, GSTP), glutathione peroxidase (GPX), and uncoupling protein 2 (UCP2) mRNA abundance of silver carp and grass carp were determined by real time-quantitative PCR. Although not significant, hepatic

[收稿日期] 2008-07-10

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30670367); 国家科技部 863 项目(2007AA09Z437); 广东省科技计划项目(2007B020701002, 2005B20301005)

[作者简介] 王琳(1980-), 女, 博士研究生; 研究方向: 鱼类去毒相关基因研究工作。E-mail: wanglin0527@126.com

通讯作者: 梁旭方, Tel: 020-85221497, E-mail: tliangxf@jnu.edu.cn

phase II xenobiotic metabolizing enzyme GSTA and GSTR in response to MC-LR still play a potential role for fish in MC-LR metabolism. The different induction might relate to the tolerance of the freshwater fishes to microcystins, toxin dose, as well as exposure time. The rather complex and insignificant response of GST gene to the effect of LPS exposure, might possibly be critical to the freshwater fishes to utilize toxic blue-green algae. In addition, GPX is essential to the detoxification of cyanotoxins by providing GSH for GST, and UCP2 also has an important role in inhibiting the excessive production of ROS to restrain fish hepatocytes apoptosis.

[Key words] Microcystin-LR; lipopolysaccharide; soluble glutathione S-transferase; glutathione peroxidase; uncoupling protein 2; gene expression; real time PCR; freshwater fishes

微囊藻毒素-LR(microcystins-LR, MC-LR)是蓝藻的一些属产生的单环七肽,在发生水华的水体中普遍存在^[1],因其高急性毒性,强促癌活性而受到广泛的关注.水体中含一定浓度的MCs可导致鱼卵变形、鱼类行为和生长异常及死亡^[2],对人类健康也构成严重威胁^[3].有研究结果表明谷胱甘肽S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)通过催化微囊藻毒素与还原型谷胱甘肽(GSH)发生加合反应,降低微囊藻毒素毒性并将其直接经排泄系统排出体外,在微囊藻毒素去毒过程中发挥关键作用^[4].谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidases, GPX),是细胞内消除ROS的主要抗氧化酶,可通过还原过氧化脂质分子减轻肝细胞脂质过氧化的加剧,从而避免肝细胞凋亡.解偶联蛋白2(uncoupling protein 2, UCP2)在抑制细胞线粒体ROS的过量生成与防止细胞凋亡方面均起重要作用^[5].最近研究表明,来源于包括蓝藻(蓝细菌)在内的Gram氏阴性菌的调制因子脂多糖(LPS)对鱼类GST酶活性有显著作用^[6].此外,由于这些调制因子的作用可能涉及GST酶合成过程而与GST基因的表达调控有关^[7-8],这使鱼类微囊藻毒素去毒代谢相关基因的表达调控机理的研究成为热点.本研究通过 $50 \mu\text{g} \cdot (\text{kg 体质量})^{-1}$ MC-LR、 $2 \text{ mg} \cdot (\text{kg 体质量})^{-1}$ LPS和 $50 \mu\text{g} \cdot (\text{kg 体质量})^{-1}$ MC-LR + $2 \text{ mg} \cdot (\text{kg 体质量})^{-1}$ LPS分别活体腹腔注射鲢鱼、草鱼24 h后,研究MC-LR和LPS对鲢鱼、草鱼肝脏GSTA、GSTR、GPX和UCP2等去毒相关基因活体诱导表达的影响,以期为淡水鱼类微囊藻毒素去毒分子机理研究提供资料.

1 材料与方法

实验鲢鱼8~12 g、草鱼6~10 g由广东罗非鱼

良种场提供.实验鱼捕捞后转到实验室暂养.96 L水族箱中驯养3周以上,喂食购买的经济鱼食.驯养期自然死亡率低于10%.鱼类养殖用水为曝气除氯的自来水,水温为 $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$,饲养期间连续充氧,自然光照周期下饲养于室内,用于染毒试验.MC-LR为Alexis公司产品,LPS为Sigma公司产品.实时荧光定量试剂盒采用Flash SYBR Green qPCR kit(Finnzymes).

1.1 实验鱼毒素暴露试验

实验室中驯养3周以上的鲢鱼、草鱼各24尾随机分成4组,每组6尾,用于染毒试验.经人工饲养排毒后的实验鱼染毒方式采用腹腔注射,以磷酸缓冲液(PBS)为溶剂,MC-LR的注射量为 $50 \mu\text{g} \cdot (\text{kg 体质量})^{-1}$,LPS注射量为 $2 \text{ mg} \cdot (\text{kg 体质量})^{-1}$,MC-LR + LPS注射量为 $50 \mu\text{g} \cdot (\text{kg 体质量})^{-1} + 2 \text{ mg} \cdot (\text{kg 体质量})^{-1}$,对照组直接注射PBS.24 h后冰冻麻醉,分离肝脏组织.

1.2 总RNA提取和cDNA第一链的合成

从实验鱼分离肝脏组织,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.分别测定样品在260和280 nm波长的吸光度值,计算RNA样品的浓度和纯度.取 $1 \mu\text{g}$ 纯化的总RNA,使用TOYOBO公司的ReverTra Ace- α -TM试剂盒进行cDNA第一链的合成, -20°C 保存备用.

1.3 引物

分别根据已发表的鲢鱼、草鱼GSTA(GenBank: EF100904, EF100905)、GSTR(GenBank: EU107282, EU107283)、GPX(GenBank: EU108012, EU108013)、UCP2(GenBank: EF100900, AY948546)和 β -肌动蛋白(GenBank: AF301605, M25013)基因核

苷酸序列设计 5 对特异引物,预期扩增鲢鱼、草鱼 GSTA、GSTR、GPX、UCP2 和 β -肌动蛋白(β -ACT) cDNA 片段大小分别为 206、196、192、213 和 215 bp (表 1)。上述引物均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

表 1 鲢鱼和草鱼 GSTA、GSTR、GPX、UCP2 和 β -肌动蛋白基因荧光定量 PCR 引物

引物名称	引物序列
FQ-GSTA01F	5'-AAGACCTTAAGAACGGGC-3'
FQ-GSTA02R	5'-GCTCAACTGCTTCCAC-3'
FQ-GSTR01F	5'-CCAGATGATCCAGCTGAAC-3'
FQ-GSTR02R	5'-CCATCTTCTCCAAGTATCC-3'
FQ-GPX01F	5'-GTGAACAGGAATGACATCG-3'
FQ-GPX02R	5'-ACTGGACGCTCTATCTTGC-3'
FQ-UCP01F	5'-GTTAGACTTCAGATTCAAGG-3'
FQ-UCP02R	5'-GTCTAGAACTGCTTGACTG-3'
FQ-ACT01F	5'-CGTGACATCAAGGAGAAG-3'
FQ-ACT02R	5'-GAGTTGAAGGTGCTCTCAT-3'

1.4 实时荧光定量 PCR

以 β -肌动蛋白为外参照,采用实时荧光定量 RT-PCR 测定 MC-LR 和 LPS 对鲢鱼、草鱼肝脏 GSTA、GSTR、GPX 和 UCP2 的诱导表达的影响。实时荧光定量 PCR 用 Flash SYBR Green qPCR 试剂盒 (Finnzymes) 在 ABI7300 荧光定量 PCR 仪上进行,PCR 反应体系总量 20 μ L: cDNA 1 μ L, 2 \times master 混

合物 10 μ L, 50 \times ROX 染料 0.3 μ L, 引物 20 μ mol/L 各 0.5 μ L, 加双蒸水至 20 μ L。PCR 扩增条件为 55 $^{\circ}$ C 2 min, 95 $^{\circ}$ C 3 min, 40 个循环的条件是 94 $^{\circ}$ C 20 s, 55 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 35s。PCR 结束后对扩增产物进行溶解曲线分析,以确保特异性扩增,并在反应结束后经体积分数 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。每个样品设 3 个重复,以未加模板的 PCR 反应样品作为阴性对照。实时荧光定量 PCR 结果用 ABI 7300 System Software 系统进行分析。

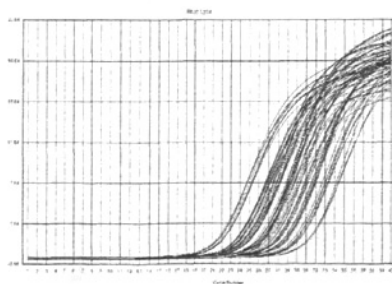
1.5 数据处理

实时荧光定量 PCR 结果由 ABI 7300 System Software 系统进行分析,以 β -肌动蛋白表达量校正目的基因的相对表达量,以对照组比值为 1,确定各实验组目的基因的诱导表达情况。标本重复性及组间差异比较采用 SPSS 13.0 进行统计。所有结果以均数 \pm 标准差表示,进行单因素方差分析,组间比较采用 LSD 方法,显著性差异表示为 $P < 0.05$ 。

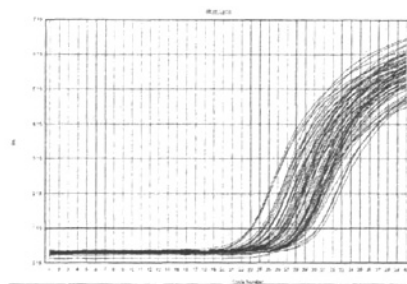
2 结果

2.1 扩增效率一致性分析

将所有样本 cDNA 进行实时荧光定量 PCR 扩增,均得到呈“S”形的动力学曲线,扩增曲线平滑,每条曲线均有明显的指数扩增期,CT 值都落在准确的定量范围以内,因此定量结果可靠,且曲线斜率基本一致,证明不同基因扩增效率一致(图 1)。



(A) 鲢鱼 GSTA、GSTR、GPX、UCP2 和 β -肌动蛋白基因扩增曲线



(B) 草鱼 GSTA、GSTR、GPX、UCP2 和 β -肌动蛋白基因扩增曲线

图 1 部分标本的 Real-time PCR 扩增曲线图

2.2 PCR 产物的特异性分析

溶解曲线经系统自动分析,扩增峰值单一,产物的解链温度值均一(如:鲢鱼 UCP2 产物的溶解曲线峰值均在约 86 $^{\circ}$ C,草鱼 β -肌动蛋白产物的溶解曲线峰值均在约 84 $^{\circ}$ C(图 2))。再将部分标本的

GSTA、GSTR、GPX、UCP2 和 β -肌动蛋白基因荧光定量 PCR 产物,经体积分数 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示 PCR 产物片段均为单一条带,且大小正确(分别为 215、206、196、192 和 213 bp)(图 3),证明产物扩增具有特异性。

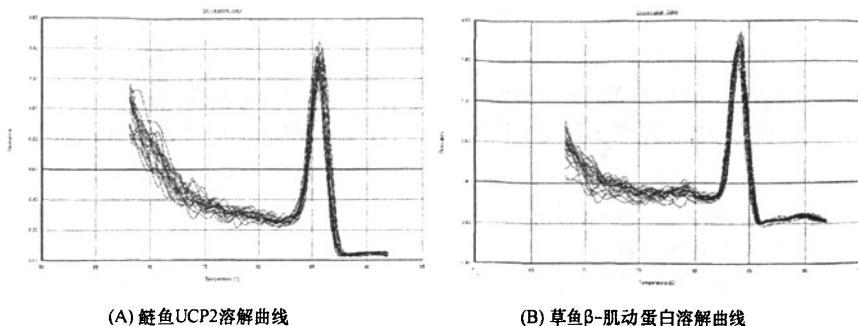
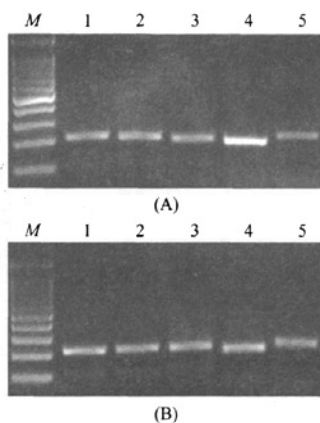


图2 部分标本的 Real-time PCR 溶解曲线图



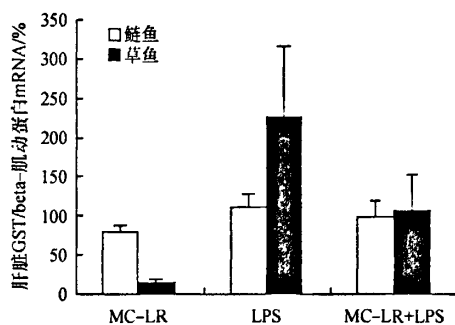
M: 100 bp DNA Ladder; 1: β -肌动蛋白基因; 2: GSTA 基因; 3: GSTR 基因; 4: GPX 基因; 5: UCP2 基因

图3 鲢鱼(A)、草鱼(B) β -肌动蛋白、GSTA、GSTR、GPX 和 UCP2 基因 PCR 电泳图

2.3 微囊藻毒素和脂多糖对鲢鱼、草鱼肝脏 GSTA、GSTR、GPX 和 UCP2 基因 mRNA 表达的影响

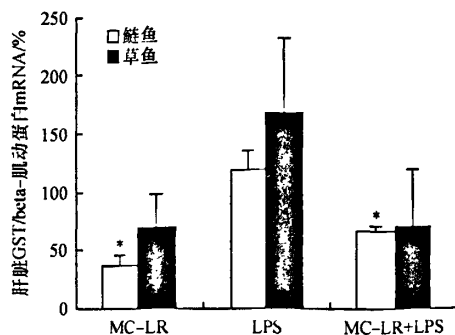
采用实时荧光定量 PCR,以 β -肌动蛋白表达量校正目的基因的相对表达量,以对照组比值为 1,确定 MC-LR 和 LPS 对鲢鱼、草鱼肝脏 GSTA、GSTR、GPX 和 UCP2 基因 mRNA 诱导表达的影响。结果表明,腹腔注射 $50 \mu\text{g} \cdot (\text{kg 体质量})^{-1}$ MC-LR 24 h 后,鲢鱼肝脏 GSTA、GSTR ($P < 0.05$) 和 GPX ($P < 0.05$) 下降,UCP2 ($P < 0.05$) 基因 mRNA 表达水平表现为升高;草鱼 GSTA、GSTR 和 UCP2 基因 mRNA 表达水平表现为降低,GPX 基因 mRNA 表达水平均表现为升高。腹腔注射 $2 \text{ mg} \cdot (\text{kg 体质量})^{-1}$ LPS 24 h 后,鲢鱼 GSTA、GSTR 和 UCP2 基因 mRNA 表达水平均升高,GPX 则降低;草鱼 GSTA 和 GSTR 基因 mRNA 表达水平升高,GPX 和 UCP2 基因 mRNA 表达水平降低。腹腔注射 $50 \mu\text{g} \cdot (\text{kg 体质量})^{-1}$

MC-LR + $2 \text{ mg} \cdot (\text{kg 体质量})^{-1}$ LPS 24 h 后,鲢鱼 GSTA 和 GSTR ($P < 0.05$) 基因 mRNA 表达水平降低,GPX 和 UCP2 ($P < 0.05$) 升高;草鱼 GSTA 和 GPX 基因 mRNA 表达水平升高,GSTR 和 UCP2 均降低(图 4~7)。



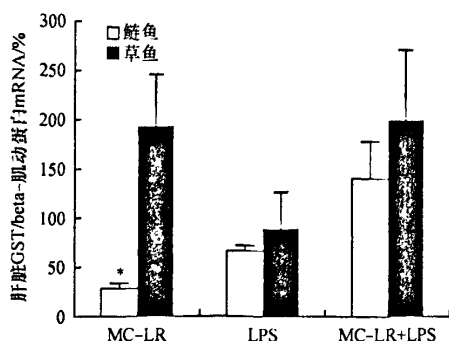
MC-LR: $50 \mu\text{g} \cdot (\text{kg 体质量})^{-1}$; LPS: $2 \text{ mg} \cdot (\text{kg 体质量})^{-1}$; MC-LR + LPS: $50 \mu\text{g} \cdot (\text{kg 体质量})^{-1} + 2 \text{ mg} \cdot (\text{kg 体质量})^{-1}$; 鲢鱼 GSTA/ β -actin mRNA (%) 白色表示,草鱼 GSTA/ β -actin mRNA (%) 黑色表示

图4 鲢鱼、草鱼肝脏 GSTA 基因表达



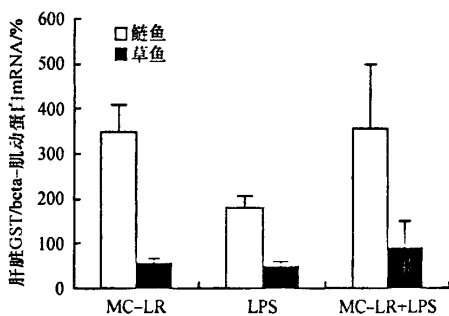
MC-LR: $50 \mu\text{g} \cdot (\text{kg 体质量})^{-1}$; LPS: $2 \text{ mg} \cdot (\text{kg 体质量})^{-1}$; MC-LR + LPS: $50 \mu\text{g} \cdot (\text{kg 体质量})^{-1} + 2 \text{ mg} \cdot (\text{kg 体质量})^{-1}$; 鲢鱼 GSTR/ β -actin mRNA (%) 白色表示,草鱼 GSTR/ β -actin mRNA (%) 黑色表示,显著性差异“*”表示

图5 鲢鱼、草鱼肝脏 GSTR 基因表达



MC-LR: $50 \mu\text{g} \cdot (\text{kg 体质量})^{-1}$; LPS: $2 \text{ mg} \cdot (\text{kg 体质量})^{-1}$; MC-LR + LPS: $50 \mu\text{g} \cdot (\text{kg 体质量})^{-1} + 2 \text{ mg} \cdot (\text{kg 体质量})^{-1}$; 鲢鱼 GPX/ β -actin mRNA (%) 白色表示, 草鱼 GPX/ β -actin mRNA (%) 黑色表示, 显著性差异“*”表示

图6 鲢鱼、草鱼肝脏 GPX 基因表达



MC-LR: $50 \mu\text{g} \cdot (\text{kg 体质量})^{-1}$; LPS: $2 \text{ mg} \cdot (\text{kg 体质量})^{-1}$; MC-LR + LPS: $50 \mu\text{g} \cdot (\text{kg 体质量})^{-1} + 2 \text{ mg} \cdot (\text{kg 体质量})^{-1}$; 鲢鱼 UCP2/ β -actin mRNA (%) 白色表示, 草鱼 UCP2/ β -actin mRNA (%) 黑色表示

图7 鲢鱼、草鱼肝脏 UCP2 基因表达

3 讨论

最近研究表明,腹腔注射 $50 \mu\text{g} \cdot (\text{kg 体质量})^{-1}$ MC-LR 可使尼罗罗非鱼去毒代谢过程中起重要作用的 GST 基因 mRNA 表达水平出现显著性升高 ($P < 0.05$), GPX 和 UCP2 基因表达也有明显的诱导趋势^[9]。大量研究表明, GST 在微囊藻毒素去毒代谢过程中扮演了重要角色^[10-11]。Gehring 等^[12] 研究证实小鼠在 MC-LR 诱导下,其 GST 活性增加同时也伴随着相应基因转录表达的增强,这为从基因水平上开展淡水生态系统中鱼类微囊藻毒素去毒分子机理的系统研究提供了思路。我们先前研究表明,鲢鱼腹腔注射 $50 \mu\text{g} \cdot (\text{kg 体质量})^{-1}$ MC-LR, 8 h GSTA 和 GSTR 基因表达的增强, 24 h 鲢鱼 GSTA 和 GSTR 基因表达呈下降趋势;草鱼 GSTA 和 GSTR

基因表达在 8 h 和 24 h 均降低^[13]。在本研究中,相同浓度 MC-LR 处理 24 h, 鲢鱼和草鱼 GSTA 和 GSTR 基因表达下降的程度更严重,与先前结果一致,可能与不同淡水鱼类对 MC-LR 的敏感性和耐受性不同有关。

Best 等^[7] 研究发现,影响 GST 活性的调制因子,其作用只有在活体处理时才存在,因而推断调制因子的作用可能涉及 GST 的合成过程,与 GST 基因转录调控有关。腹腔注射 $2 \text{ mg} \cdot (\text{kg 体质量})^{-1}$ LPS 24 h 后,鲢鱼和草鱼 GSTA、GSTR 表达水平均升高。腹腔注射 $50 \mu\text{g} \cdot (\text{kg 体质量})^{-1}$ MC-LR + $2 \text{ mg} \cdot (\text{kg 体质量})^{-1}$ LPS 24 h 后, GSTA 和 GSTR 在鲢鱼体内降低; GSTA 在草鱼升高, GSTR 在草鱼体内降低。我们先前研究获得了尼罗罗非鱼、鲢鱼 GSTA 基因调控区 (5'-侧翼区) 序列,并在 GSTA 基因调控区均存在对 LPS 起反应的调控位点 (LPS 反应元件, LPSRE), 提示着 LPS 对 GST 的潜在调控作用^[14-15]。进一步研究发现, LPS 对罗非鱼肝脏 GSTA 基因组成型表达水平没有显著作用,对罗非鱼肝脏 GSTA 基因诱导型表达水平 (微囊藻毒素诱导后的表达水平) 有较小的抑制作用,这是首次从基因表达水平上证实 LPS 对鱼类肝脏 GSTA 的抑制作用,通过调节去毒酶基因的转录表达,影响其去毒效率^[14]。我们在鲢鱼、草鱼中观察到 LPS 对 GSTA 和 GSTR 基因组成型、诱导型的作用,可能与调制因子 LPS 对不同生态习性淡水鱼类肝脏 GST 基因表达水平的调制作用不同有关。本研究中鲢鱼、草鱼处于 $50 \mu\text{g} \cdot (\text{kg 体质量})^{-1}$ MC-LR 和 $50 \mu\text{g} \cdot (\text{kg 体质量})^{-1}$ MC-LR + $2 \text{ mg} \cdot (\text{kg 体质量})^{-1}$ LPS 压力的环境中,体内一些对 ROS 敏感的抗毒相关基因 (GPX 或 UCP2) 的转录表达有明显的升高,甚至出现显著的诱导表达,而在参与 MC-LR 去毒代谢和催化加合排毒过程中起十分重要作用的 GST 却没有表现出明显的诱导趋势。这可能因为微囊藻毒素进入鱼肝细胞后,使细胞中产生大量活性氧分子,这些活性氧分子将脂质分子氧化为过氧化脂质分子,以自由基链式反应的方式对肝脏造成严重损伤。在肝脏抗氧化胁迫与抑制过量 ROS 发生方面起重要作用的 GPX 与 UCP2 分别被诱导,过氧化脂质分子在谷胱甘肽过氧化物酶 GPX 的作用下,被 GSH 还原生成 GSSG 和还原型脂质分子,而 GST 则催化 GSH 与微囊藻毒素结合,成为水溶性化合物排出体外,起到解毒作用。与此同时,肝脏通过诱导 UCP2

基因表达来抑制肝细胞内 ROS 的过量生成与肝细胞凋亡的发生^[4-5],进而保护肝脏免受 ROS 导致的损伤。而对于鲢鱼 UCP2 在抑制过量 ROS 发生过程中起主要作用,而草鱼 GPX 在肝脏抗氧化胁迫方面起重要作用。不同生态习性淡水鱼类肝脏 GST 基因微囊藻毒素诱导后表达水平升高的幅度,是否与各自的组成型表达水平均存在这种负相关关系,并且升幅的大小次序是否与这些淡水鱼类对微囊藻毒素耐受能力的高低次序基本一致,还需进一步确定。目前,淡水鱼类微囊藻毒素去毒代谢相关基因的精细结构、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以增强淡水鱼类微囊藻毒素去毒基因的表达式以减轻急性或长期接触导致的致毒作用,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] CARMICHAEL W W. The toxins of cyanobacteria [J]. *Sci Am*, 1994, 270: 64-72.
- [2] LINDHOLM T, ÖHMAN P, KURKI-HELASMO K, et al. Toxic algae and fish mortality in a brackish-water Lake in Åland, SW Finland [J]. *Hydrobiologia*, 1999, 397: 109-120.
- [3] POURIA S, ANDRADE A, BARBOSA J, et al. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil [J]. *Lancet*, 1998, 352: 21-26.
- [4] PFLUGMACHER S, WIEGAND C, OBEREMM A, et al. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1425: 527-533.
- [5] LIANG X F, OGATA H Y, OKU H, et al. Abundant and constant expression of uncoupling protein 2 in the liver of red sea bream *Pagrus major* [J]. *Comp Biochem Physiol A*, 2003, 136(3): 655-661.
- [6] BEST J H, PFLUGMACHER S, WIEGAND C, et al. Effects of enteric bacterial and cyanobacterial lipopolysaccharides, and of microcystin-LR, on glutathione S-transferase activities in zebra fish (*Danio rerio*) [J]. *Aquat Toxicol*, 2002, 60: 223-231.
- [7] BEST J H, PFLUGMACHER S, WIEGAND C. Effects of enteric bacterial and cyanobacterial lipopolysaccharides and of microcystin-LR, on glutathione S-transferase activities in zebra fish (*Danio rerio*) [J]. *Aquat Toxicol*, 2002, 60: 223-231.
- [8] BEST J H, EDDY F B, CODD G A. Effects of Microcystis cells, cell extracts and lipopolysaccharide on drinking and liver function in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum [J]. *Aquat Toxicol*, 2003, 64: 419-426.
- [9] 王琳,梁旭方,廖婉琴,等. 罗非鱼微囊藻毒素去毒相关基因克隆与活体表达研究[J]. *水生生物学报*, 2007, 31(6): 788-798.
- [10] BEATTIE K A, RESSLER J, WIEGAND C, et al. Comparative effects and metabolism of two microcystins and nodularin in the brine shrimp *Artemia salina* [J]. *Aquat Toxicol*, 2003, 62: 219-226.
- [11] MONOD G, BOUDRY M A, GILLET C. Biotransformation enzymes and their induction by B-naphthoflavone during embryolarval development in salmonid species [J]. *Comp Biochem Physiol C*, 1996, 114: 45-50.
- [12] GEHRINGER M M, SHEPHARD E G, DOWNING T G, et al. An investigation into the effect of selenium supplementation on microcystin hepatotoxicity [J]. *Toxicol*, 2003, 41: 451-458.
- [13] LIANG X F, LI G G, HE S, et al. Transcriptional responses of alpha- and rho-class glutathione S-transferase genes in the liver of three freshwater fishes intraperitoneally injected with microcystin-LR: relationship of inducible expression and tolerance [J]. *Journal of Biochemistry and Molecular Toxicology*, 2007, 21: 289-298.
- [14] WANG L, LIANG X F, LIAO W Q, et al. Structural and functional characterization of microcystin detoxification-related liver genes in a phytoplanktivorous fish, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Comp Biochem Physiol C*, 2006, 144: 216-227.
- [15] LIAO W Q, LIANG X F, WANG L, et al. Molecular cloning and characterization of alpha-class glutathione S-transferase gene from the liver of silver carp, bighead carp and other major Chinese freshwater fishes [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2006, 20: 114-126.

[责任编辑:黄建军]