

# 河豚毒素在暗纹东方鲀体内的转移分布规律 及相关代谢酶活性分析

卢义博<sup>1,2</sup>, 曾军杰<sup>2,3</sup>, 陈思<sup>3</sup>, 王瑞瑞<sup>3</sup>, 张小军<sup>2</sup>

(1. 浙江海洋大学水产学院, 浙江舟山 316021) (2. 浙江省海洋水产研究所, 浙江舟山 316021)

(3. 浙江海洋大学食品与药学学院, 浙江舟山 316021)

**摘要:** 为了研究河豚毒素(TTX)在暗纹东方鲀体内的转移分布规律及其对肝脏代谢酶活性的影响, 实验选择口服灌喂的给药方式, 通过超高效液相色谱串联质谱法测定不同组织中TTX的浓度变化, 同时测定肝脏代谢酶活力。结果如下, 在灌喂TTX后的短期转移分布期间, 性腺中TTX的浓度从19.00 ng/g升至42.02 ng/g, 蓄积率为121%。肝脏中TTX浓度呈波动性变化, 在4 h时, TTX浓度最高为11.43 ng/g, 在48 h时, TTX浓度最低为1.27 ng/mL。皮肤、肌肉、血液、肠道、鳃组织中TTX含量在2 h时最高, 分别为7.43 ng/g、1.15 ng/g、11.44 ng/g、9.77 ng/g、31.75 ng/g。脾脏、肾脏、胆组织中TTX浓度分别在2 h、4 h、6 h时最高为5.05 ng/g、6.54 ng/g、9.06 ng/g。此外, 肝脏代谢酶活力的检测结果显示, TTX显著提高了乳酸脱氢酶、谷草转氨酶和谷丙转氨酶的活性( $p < 0.05$ ), 在前期对两种磷酸酶活性具有明显的抑制效应( $p < 0.05$ ), 而后恢复至正常水平。实验结果表明, TTX在暗纹东方鲀中的转移分布具有组织特异性, 并且对肝脏中不同代谢酶活性具有促进和抑制作用。

**关键词:** 暗纹东方鲀; 灌喂; 河豚毒素; 组织含量; 相对毒素量; 肝脏; 代谢酶活性

文章编号: 1673-9078(2021)06-129-135

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.6.1055

## The Transfer and Distribution of Tetrodotoxin in *Takifugu obscurus* and the Activity Analysis of Related Metabolic Enzymes

LU Yi-bo<sup>1,2</sup>, ZENG Jun-jie<sup>2,3</sup>, CHEN Si<sup>3</sup>, WANG Rui-rui<sup>3</sup>, ZHANG Xiao-jun<sup>2</sup>

(1. Fisheries College of Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316021, China)

(2. Marine Fisheries Research Institute of Zhejiang, Zhoushan 316021, China)

(3. School of Food and Pharmacy of Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316021, China)

**Abstract:** In order to study the transfer and distribution of tetrodotoxin (TTX) in *Takifugu obscurus* and its activity on liver metabolizing enzymes, the oral gavage administration method was used in the experiment. The concentration changes of TTX in different tissue were measured by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, and the activity of metabolic enzymes in the liver was also measured. The results were as follows, during the short-term metastasis distribution period after TTX instillation, the concentration of TTX in the gonads increased from 19.00 ng/g to 42.02 ng/g, and the accumulation rate was 121%. The TTX concentration was fluctuated in the liver. At 4 h, the highest TTX concentration was 11.43 ng/g, at 48 h, the lowest TTX concentration was 1.27 ng/mL. The TTX contents in the tissues of skin, muscle, blood, intestine, and gills were highest at 2 h, which were 7.43 ng/g, 1.15 ng/g, 11.44 ng/g, 9.77 ng/g, and 31.75 ng/g, respectively. The highest TTX concentrations in the spleen, kidney and gallbladder tissues were 5.05 ng/g, 6.54 ng/g, and 9.06 ng/g at 2 h, 4 h, and 6 h, respectively. In addition, the test results of liver metabolic enzyme activity showed that TTX significantly increased the activities of lactate

引文格式:

卢义博, 曾军杰, 陈思, 等. 河豚毒素在暗纹东方鲀体内的转移分布规律及相关代谢酶活性分析[J]. 现代食品科技, 2021, 37(6): 129-135, +265

LU Yi-bo, ZENG Jun-jie, CHEN Si, et al. The transfer and distribution of tetrodotoxin in *Takifugu obscurus* and the activity analysis of related metabolic enzymes [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(6): 129-135, +265

收稿日期: 2020-11-16

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFC1600701)

作者简介: 卢义博(1994-), 男, 硕士, 研究方向: 水产品质量安全

通讯作者: 张小军(1982-), 男, 博士, 高级工程师, 研究方向: 水产品质量安全

dehydrogenase, aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase ( $p < 0.05$ ). And it had a significant inhibitory effect on two phosphatase activities in the early stage ( $p < 0.05$ ), and then returned to normal levels. The results indicate that the transfer and distribution of TTX in *Takifugu obscurus* has tissue specificity, and can promote and inhibit the activities of different metabolic enzymes in the liver.

**Key words:** *Takifugu obscurus*; irrigation; tetrodotoxin; tissue content; relative toxin content; liver; metabolic enzyme activity

暗纹东方鲀 (*Takifugu obscurus*) 主要分布在中国近海和长江中下游, 其肉质鲜美, 营养价值丰富, 但是野生河豚鱼体内均含有河豚毒素 (Tetrodotoxin, TTX) 可致人死亡。TTX 是一种强效的海洋神经毒素, 由 Yoshizumi Tahara 在 1909 年首次发现<sup>[1]</sup>, 在 1964 年由 Woodward、Hirata Yoshimasa 和 Tsuda Kyosuke 同时确证了河豚毒素的正确结构<sup>[2]</sup>。TTX 作为一种高度选择性的钠通道阻滞剂, 可与肌肉或神经细胞的细胞膜上受体结合, 从而使钠离子通道关闭, 降低  $\text{Na}^+$  通道传导性, 阻断动作电位, 抑制神经和肌肉之间的兴奋传导, 导致肌肉和神经麻痹, 情况严重时, 可致人死亡<sup>[3]</sup>。河豚毒素的毒性属于剧毒物质, 人体的最小致死量为  $0.5 \text{ mg}$ <sup>[4]</sup>。目前, 已在多种海洋生物和陆地生物种检测出河豚毒素, 日本<sup>[5]</sup>、中国<sup>[6]</sup>、泰国<sup>[7]</sup>、巴西<sup>[8]</sup>等多个国家发现多起河豚毒素中毒事件。

目前, 关于河豚毒素的起源仍存在争议。Yasumoto<sup>[9]</sup>和 Noguchi<sup>[10]</sup>认为河豚鱼可能并不能够产生河豚毒素, 而是通过食物链获得毒素。Matsui 等<sup>[11]</sup>、Yamamori 等<sup>[12]</sup>、Honda 等<sup>[13]</sup>、Kono 等<sup>[14]</sup>发现, 经过长期人工养殖和培育的河豚鱼其体内不含有河豚毒素, 但是通过投喂含有河豚毒素的饲料后又重新获得毒性。因此, 河豚鱼必然存在相应的耐受机制来应对河豚毒素的蓄积。肝脏作为生物体内最重要的代谢器官, 其组织中含有大量丰富的代谢酶。谷草转氨酶 (AST) 和谷丙转氨酶 (ALT) 是肝脏生化反应中不可或缺的催化剂, 是肝功能测试的重要指标<sup>[15]</sup>。碱性磷酸酶 (AKP) 和酸性磷酸酶 (ACP) 在机体生长代谢和生理健康过程中起发挥重要作用, 同时是检测机体受到损伤的重要指标<sup>[16]</sup>。乳酸脱氢酶 (LDH) 参与多种供能反应, 在能量代谢过程当中发挥重要作用<sup>[17]</sup>。

本实验选择国内开放养殖的暗纹东方鲀为研究对象, 采用口服灌喂河豚毒素的方法, 利用超高效液相色谱串联质谱法 (UPLC-MS/MS) 测定河豚毒素在不同时间的组织含量, 分析暗纹东方鲀体内的河豚毒素分布转移规律, 为河豚鱼养殖提供指导建议, 同时测定肝脏组织中五种代谢酶的活力, 初步探讨了暗纹东方鲀对河豚毒素的耐受性。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与饲养

实验动物采购地点为福建省漳州市东坂村, 品种为暗纹东方鲀, 实验鱼个体平均体长  $15.4 \pm 0.7 \text{ cm}$ , 平均体重  $232 \pm 25 \text{ g}$ 。采用 GB 5009.206-2016 方法对实验鱼进行 UPLC-MS/MS 检测得出本批次实验鱼各组织中均不含有 TTX。

将暗纹东方鲀体长置于 120 L 淡水 (盐度 8‰~10‰) 中, 每个水箱 10 尾, 温度  $22 \sim 25 \text{ }^\circ\text{C}$ 。溶氧量大于  $6 \text{ mg/L}$ , 氨氮量小于  $1 \text{ mg/L}$ , 增氧机 24 h 全开, 自然光照。在进行灌喂实验之前, 配合饲料喂养 7 d。每天投喂 1 次, 投喂量根据鱼重 (湿重) 3% 计算。

### 1.2 实验饵料准备

健马牌鳊鱼配合饲料, 粉末状, 水分含量小于 10%, 粗蛋白含量大于 43%, 粗纤维含量小于 4%, 氨基酸含量大于 2.1%, 粗灰分含量下小于 18%, 总磷含量大于 1%。

河豚毒素粗提取物由本实验室从河鲀肝脏中提取纯化获得, 浓度为  $8.5 \text{ } \mu\text{g/mL}$ 。将饲料、水与河豚毒素粗提取物充分混合均匀, 使其 TTX 的含量为  $850 \text{ ng/mL}$ 。

### 1.3 试剂与材料

河豚毒素标准品, 纯度  $\geq 98.0\%$ , 德国 Dr.Ehrenstorfer 公司; 甲醇、乙腈均为色谱纯, 德国 Merck 公司; 甲酸、氯化钠 ( $\text{NaCl}$ )、二水合磷酸二氢钠 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )、十二水合磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )、氢氧化钠 ( $\text{NaOH}$ ), 上海国药集团; 甲酸、醋酸铵均为色谱纯, 美国 Sigma 公司; 实验用水为超纯水; 河豚毒素免疫亲和柱, 北京美正生物科技有限公司, 柱容量:  $1000 \text{ ng}$ ; 总蛋白定量试剂盒、乳酸脱氢酶试剂盒、谷草转氨酶、谷丙转氨酶试剂盒、碱性磷酸酶、酸性磷酸酶试剂盒, 订购于南京建成生物工程研究所。

河豚毒素标准溶液配制: 准确称取河豚毒素标准品  $5.00 \text{ mg}$ , 使用  $0.1\%$  甲酸  $5 \text{ mmol/L}$  乙酸铵溶液-乙腈 (1:1,  $V/V$ ) 的混合溶液充分溶解后准确定容至  $50 \text{ mL}$ ,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  下避光储存 6 个月, 使用时用  $0.1\%$  甲酸  $5 \text{ mmol/L}$  乙酸铵溶液-乙腈 (1:9,  $V/V$ ) 的混合溶液逐

级稀释。

0.05 mol/L 磷酸缓冲盐溶液 (PBS): 分别称取 NaCl 4.25 g、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1.09 g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  6.45 g, 用超纯水定容至 500 mL, pH 约为 7。

#### 1.4 仪器与设备

Acquity™ 超高效液相色谱仪、Quattro Premier XE 串联三重四级杆质谱仪, 美国 Waters 公司; LPD2550 型多管涡旋混合仪, 莱普特科学仪器有限公司; Avanti JXN\_30 高速冷冻离心机, 美国 Beckman Coulter 公司; Nitrogen Evaporator 112 型氮吹仪, 美国 Organomatio 公司; 超声波清洗器, 上海易净超声波仪器有限公司; 固相萃取仪, 上海那艾精密仪器有限公司; 缸外过滤器 HW-704B, 森森水族公司; 盐度计, 台湾衡欣公司; 交直流电增氧泵 S-600BX、MK3 微孔板酶标仪, 美国 ThermoLabsystems 公司; 可见风光光度计, 美国瓦里安公司。

#### 1.5 实验设计与取样

将暗纹东方鲀分成空白对照组和灌喂剂量组, 空白对照组灌喂水与饲料混合液, 灌喂剂量组灌喂含量为 850 ng/mL 的水、饲料、河豚毒素粗提取物的混合饲料。每组设三个重复组。实验操作如下: 取一根特氟龙管 (外径=3 mm, 长度为 70 mm) 与 5 mL 注射器相连, 将混合的饲料匀浆 1 mL 尽可能深地插入河豚鱼的消化道, 然后将 1 mL 含 TTX 的饲料匀浆挤入消化道, 分别灌喂后, 保持鱼身直立 3~5 min, 观察河豚鱼是否通过鳃排泄饲料匀浆溶液。随后将河豚鱼放回暂养池中, 实验期间的投喂与管理与暂养期间相一致, 每天观察河豚鱼的生理情况, 及时清理水池污染物和补充新鲜干净水体。

从实验鱼灌喂饲料匀浆前作为起始 0 h 同时进行计时观察和记录。实验选择在 0 h、2 h、4 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h、168 h、336 h 分别取样, 每次取

3 条河豚鱼, 同时记录每条鱼的体重。分别收集皮肤、肌肉、肝脏、血液 (肝动脉取血)、肾脏、胆、脾、肠道、鳃各组织, 将各组织用 4 °C 的 PBS 缓冲盐溶液冲洗杂质和血液。取 1 mL 血液和 2 g 肝脏储藏在 -60 °C 的冰箱中独立储存, 其余样品均质后放置 -20 °C 冰箱中待测。

#### 1.6 不同组织中河豚毒素的提取、净化

河豚鱼体内的河豚毒素提取参照国标 GB 5009.206-2016 并做出适当修改: 称量肌肉、皮肤、肝脏等器官均质样品 2 g (少于 2 g 的组织样本全部称量) 或血液 2 mL 于 50 mL 具塞离心管中, 使用 10 mL 2% 乙酸-甲醇提取, 涡旋振荡 5 min, 60 °C 水浴超声提取 15 min, 分别在 5 min 和 10 min 时涡旋 30 s。取出恢复常温, 8000 r/min 离心 7 min。取上清液 5 mL 与 20 mL PBS 缓冲盐溶液混合均匀。加入适量 1 mol/L NaOH 溶液使 pH 至 6.8~7.2 之间, 过柱待测。

#### 1.7 TTX 检测方法

##### 1.7.1 色谱条件

色谱柱: Waters Acquity UPLC BEH Amide 柱 (100×2.1 mm, 1.7 μm); 进样量 5 μL; 样品室温度 10 °C; 柱温 40 °C; 流速: 0.3 mL/min; 流动相 A: 0.1% 甲酸 5 mmol/L 乙酸铵溶液, 流动相 B: 乙腈; 梯度洗脱条件如下: 0~1.5 min, 90%~90% B; 1.5~2 min, 90%~40% B; 2~4 min, 40%~40% B, 2~4 min, 40%~90%, B。

##### 1.7.2 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源 (electrospray ionization, ESI), 正离子模式扫描; 检测方式: 多反应监测模式 (multiple reaction monitoring, MRM); 毛细管电压: 3.5 kV; 离子源温度: 120 °C; 脱溶剂气温度: 385 °C; 脱溶剂气流量: 800 L/h; 锥孔气流量: 55 L/h; 检测参数条件见表 1。

表 1 河豚毒素质谱检测参数

Table 1 Detection parameters of tetrodotoxin mass spectrometry

分析物	保留时间/min	母离子/(m/z)	母离子/(m/z)	锥孔电压/V	碰撞能量/eV
TTX	4.14	320.1	162.1	40	35
			302.1*		25

注: \*表示定量离子 (Quantitative)。

#### 1.7.3 标准曲线的配制及回收率与精密度的考察

用 0.1% 甲酸 5 mmol/L 乙酸铵溶液-乙腈 (1:9, V/V) 的初始流动相稀释 TTX 标准品使用液, 配制成浓度为 1.00 ng/mL、2.00 ng/mL、5.00 ng/mL、10.00 ng/mL、

20.00 ng/mL、50.00 ng/mL、100.00 ng/mL 的标准曲线。外用外标法定量, 以 TTX 的物质含量为横坐标, 定量离子峰面积为纵坐标进行线性回归。

分别称量阴性暗纹河豚鱼肌肉、皮肤、肝脏、肠道、鳃 2 g; 血液 2 mL; 肾脏、胆、脾、性腺适量,

添加一定量 TTX 标准品使用液,使其不同组织浓度分别为 1.00 ng/mL、5.00 ng/mL、10.00 ng/mL, 平行样本数量为 3, 计算回收率和相对标准偏差。

### 1.8 肝脏代谢酶的检测

总蛋白的测定采用 BCA 法测定; AST 和 ALT 均采用 King 氏法测其酶活性, 单位定义为: 25 °C 时, 1 min 内产生的丙酮酸与 NADH 发生氧化反应产生 NAD<sup>+</sup>, 使得吸光度下降 0.001 位时为 1 个活力单位。AKP 和 ACP 的酶活力采取比色法测定, 其活力单位为: 100 mL 血清在 37 °C 与底物反应 30 min 生成 1 mg 酚为 1 个活力单位。LDH 酶活力使用比色法测定, 活力单位为: 每克组织蛋白 37 °C 与基质作用 15 min, 反应体系中产生 1 μmol 丙酮酸为 1 单位。

### 1.9 数据处理分析

实验结果用 SPSS 26.0 统计与分析。相关性分析选择皮尔逊系数, 单因素方差分析采用邓肯检验进行多重比较,  $p < 0.05$  表示具有显著差异性。Excel 2016 作图分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 标准曲线及回收率与精密度

实验数据显示, TTX 的浓度范围在 1.00 ng/mL~100.00 ng/mL 时线性关系较好, 回归方程式为  $y=1375.18x-53.0638$ ,  $r^2 > 0.9999$ 。

在本实验条件下, 肌肉、肝脏、皮肤、血液等不同组织中 TTX 的平均回收率均在 75.37%~90.64%, 实验相对标准偏差为 3.09%~8.08%, 小于 10%。结果表明本方法回收率和精密度可以满足检测分析要求, 适

用于河豚鱼各组织中的河豚毒素检测。

### 2.2 给药方式及剂量选择

目前关于河豚毒素的给药方式主要分为三种, 有毒饮食喂养 (Toxic diet-feeding, TDF)、肌肉给药 (Intramuscular administration, IMA) 和口服灌胃给药 (Oral gavage administration, OGA)<sup>[18]</sup>。有毒饮食喂养具有准确模拟自然界进食的特点, 但是存在个体受药不均匀的现象, 投喂耗时长、鱼体之间平行性较差的缺点。肌肉给药方式可以快速准确定量给药并且同时保证鱼体平行性, 但是肌肉注射破坏河豚鱼的免疫防御系统, 从而产生应激反应, 导致体内酶活力的改变, 从而难以区分河豚毒素带来的分子差异。口服灌胃给药方式综合了有毒饮食喂养和肌肉给药两种方式的优点, 即耗时短, 准确定量、平行性好, 同时也能够避免给药方式对河豚鱼带来生理影响。

TTX 毒性较强, 研究表明, 兔子的肌肉体内注射的最小致死量 (MLD) 为 5.30 μg/kg, 小鼠腹腔注射半数致死量 (LD50) 10.70 μg/kg<sup>[19]</sup>。综合实验室河豚毒素粗提取物的浓度以及暗纹东方鲀的状态, 选择灌胃河豚毒素浓度为 850 ng TTX/mL 混合匀浆饲料 1 mL, 即 850 ng 河豚毒素。

### 2.3 TTX 在暗纹东方鲀体内的转移分布律

在不同转移时间的条件下, 排除无法定量的血液, 暗纹东方鲀对河豚毒素吸收率如表 2 所示。

数据显示, 灌喂 2 h 后河鲀鱼对 TTX 的吸收率最高, 随后时间的增加而逐渐的减少, 在 48 h 时, TTX 的残留量达到最低, 为 18.00%; 随后 TTX 的残留量会出现低幅度的上调, 在最长转移时间内, 残留量大约稳定 31%。

表 2 暗纹东方鲀在不同转移时间下 TTX 的吸收率

Table 2 TTX absorption rate of *Takifugu obscurus* under different transfer time

转移时间/h	2	4	6	12	24	48	72	168	336
TTX 含量/ng	630.04	588.63	455.36	344.52	213.24	153.02	235.53	269.62	265.04
TTX 吸收率/%	74.12	69.25	53.57	40.53	25.09	18.00	27.71	31.74	31.18

为了探讨 TTX 的转移规律, 实验分别对不同时间下暗纹东方鲀各组织中的 TTX 含量变化和各组织的相对毒物量(占投毒总量的百分比)进行分析, 结果如图 1 和图 2 所示。在暗纹东方鲀中经灌喂给药到肠道的 TTX 被吸收到体内, 且主要转移到肝脏、皮肤、肌肉和性腺。肠道中 TTX 相对毒物量随着时间的增加而逐渐减少, 这有可能是因为肠道可以作为吸收屏障阻碍 TTX 的吸收, 或者是 TTX 迅速被肠道中的酶分解为本实验未检测出的代谢物<sup>[20]</sup>。在 2 h 时, 鳃组织中

的 TTX 含量浓度最高为 31.75 ng/g, 此时该组织的相对毒物量为 12.44%。在实验灌喂过程中发现暗纹东方鲀可以通过鳃将灌喂的 TTX 匀浆饲料排泄出来, 说明暗纹东方鲀在口服灌胃给药的方式下, 鳃是最主要的排泄器官。

性腺组织 TTX 的浓度在整个转移过程中一直处于较高水平, TTX 的浓度随着时间的增加而增加, 相对毒物量由 0.47% 逐渐上升至 1.43%, TTX 含量从 19.00 ng/g 升到 42.02 ng/g, 蓄积率为 121%。肝脏中

的 TTX 浓度普遍低于性腺,但是均高于皮肤中 TTX 的浓度。Ryohei Tatsuno 等<sup>[21]</sup>通过灌喂不同月龄的红鳍东方鲀发现,6 月龄的幼鱼,毒素含量主要集中在皮肤,其次是肝脏,而 15 月龄的河豚鱼其主要蓄积器官为肝脏,其次是皮肤和性腺。Vaishali Bane 等<sup>[22]</sup>发现,发育成熟期的河豚鱼,皮肤中的 TTX 逐渐转移至肝脏,在性成熟时期,肝脏组织中的 TTX 逐渐转移至性腺,主要是卵巢。本实验选择接近性成熟的暗纹东方鲀,肝脏发育完全,性腺接近成熟,因此性腺是本实验的主要蓄积器官,肝脏次之。同时实验发现,各脏器包括肾脏、脾脏、胆在转移分布前期 TTX 的浓度呈先升后降的趋势,作为生物代谢的主要反应器官,推测各组织参与了 TTX 前期的代谢和消除。肝脏中 TTX 的含量在 48 h 时降至最低为 1.27 ng/g,相对毒物量为 3.47%,但肝脏作为第二蓄积器官在 48 h 后组织中的 TTX 逐渐增加,在转移后期相对毒物量均占比第一。

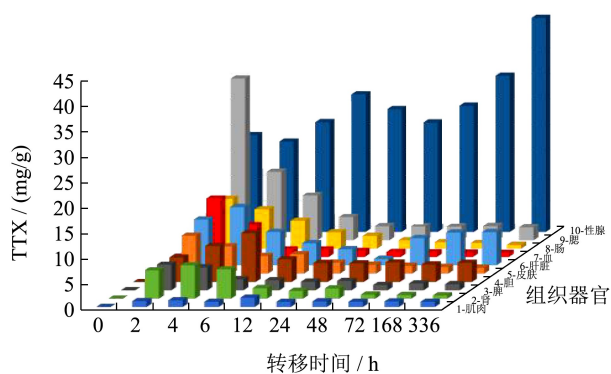


图 1 短期灌喂下暗纹东方鲀各组织中的 TTX 浓度变化  
Fig.1 Changes of TTX concentration in various tissues of *Takifugu obscurus* under short-term irrigation

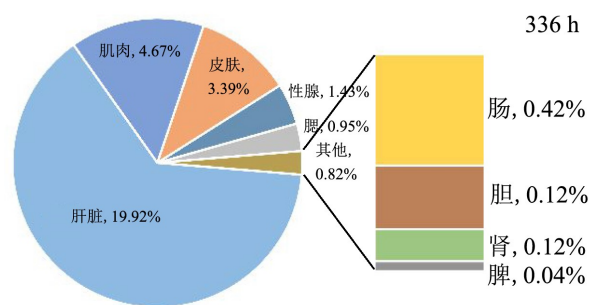
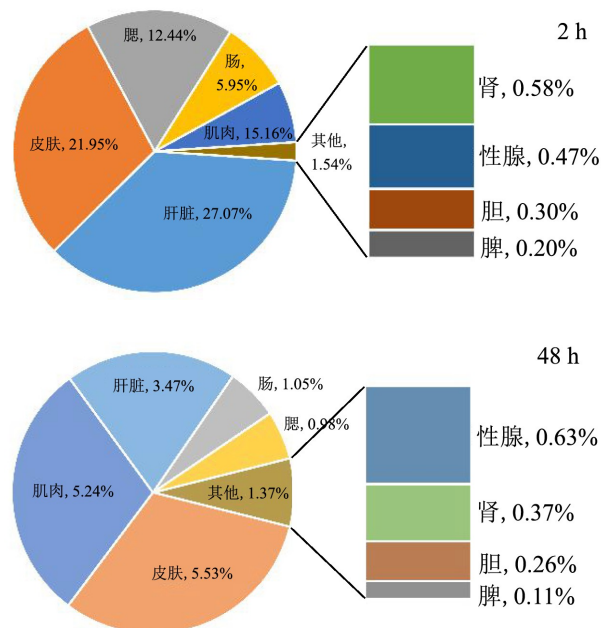


图 2 2、48、336 h 时暗纹东方鲀各组织中 TTX 相对毒物量  
Fig.2 The relative amount of TTX toxin in each tissue of *Takifugu obscurus* at 2 h, 48 h and 336 h

Takuya Matsumoto 等<sup>[23]</sup>认为河豚鱼可通过与特定的蛋白 (PSTBP) 相结合,从而降低与钠离子通道的结合所带来的神经毒性,以此来提高河豚鱼对 TTX 的耐受性。此外, Mari Yotsu-Yamashita 等<sup>[24]</sup>在 2001 年首次从豹纹东方鲀的血液中分离此蛋白,并且 Mari Yotsu-Yamashita 等<sup>[25]</sup>在 2003 年通过免疫组织化学染色法发现豹纹东方鲀中肝脏、肠道、皮肤和卵巢均含有 PSTBP。本实验发现皮肤和血液组织中的 TTX 含量在灌喂初期最高,分别为 7.43 ng/g 和 11.44 ng/g,此后随着时间的增加而逐渐降低,因此推测皮肤和血液可能通过 PSTBP 参与 TTX 的转运过程。

## 2.4 五种肝脏代谢酶的活力变化

### 2.4.1 不同时间下暗纹东方鲀肝脏中乳酸脱氢酶 (LDH) 活力变化

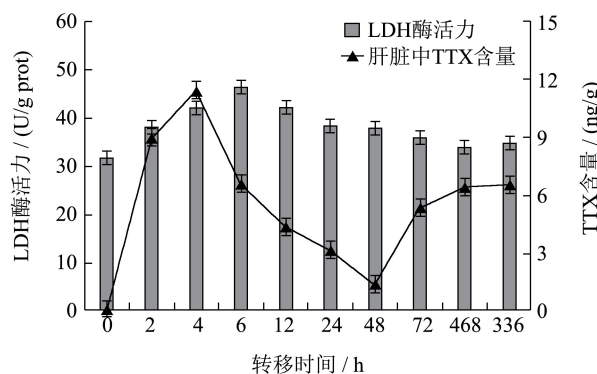


图 3 灌喂 TTX 后不同时间下肝脏中 LDH 活力和 TTX 含量的变化  
Fig.3 Changes of LDH activity and TTX content in the liver at different times after feeding TTX

随着转移时间的增加和肝脏中 TTX 的含量不断改变,肝脏中的 LDH 活力变化如图 3 所示。SPSS 双变量相关分析得出,LDH 活力与 TTX 的含量的相关系数 0.415,  $p=0.233$  ( $p>0.05$ ),说明两者之间相关不显著。肝脏中的 LDH 活性呈波动性变化,首先在 0~24 h 时先升高后降低,在第 6 h 出现峰值,且峰值显著性高于其它值 ( $p<0.05$ )。其次在 24 h 后逐渐趋于稳定

状态,且无明显差异 ( $p>0.05$ ),此时 LDH 活力高于 0 h,即灌喂 TTX 后暗纹东方鲀肝脏中 LDH 活力略微升高。LDH 是糖无氧酵解及糖异生反应中的重要参与酶,在生物氧化还原反应中发挥重要作用,Jonna A. Berges 等<sup>[26]</sup>研究发现 LDH 可以作为衡量无氧代谢水平的检测指标之一。LDH 活力升高说明灌喂 TTX 后河豚鱼无氧代谢反应旺盛,糖酵解反应持续进行,可为组织器官转移代谢河豚毒素提供了能量,提高了机体的耐受量。

### 2.4.2 不同时间下暗纹东方鲀肝脏中转氨酶活力变化

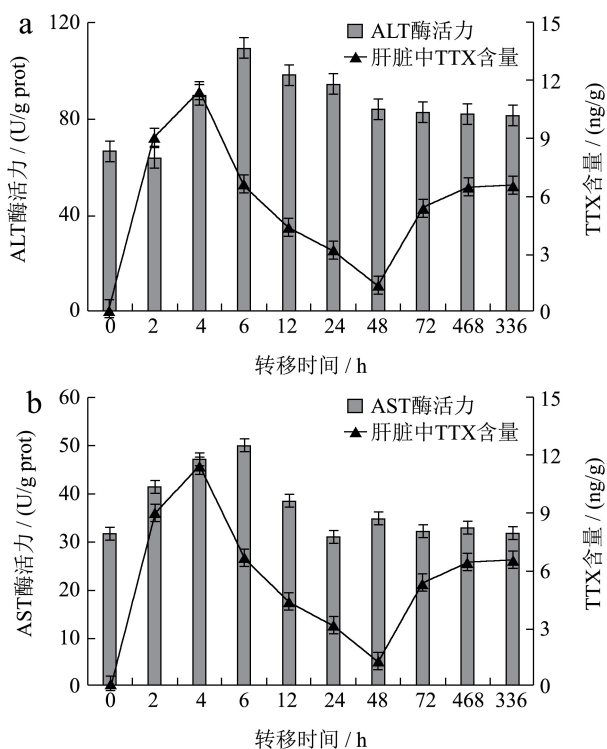


图4 灌喂 TTX 后不同时间下肝脏中 ALT (a) 和 AST (b) 活力与 TTX 含量的变化

Fig.4 Changes of ALT (a) and AST (b) activity and TTX content in the liver at different times after feeding TTX

肝脏中 TTX 含量及 ALT 和 AST 活性随时间的变化趋向如图所示。SPSS 双变量相关分析得出,ALT 活性与 TTX 的含量的相关系数为 0.109,  $p=0.765$  ( $p>0.05$ ),说明两者之间相关不显著。AST 活力与 TTX 的含量的相关系数为 0.649,  $p=0.042$  ( $p<0.05$ ),说明两者之间显著相关。

ALT 和 AST 活力变化趋势相似,呈先升高后降低最终趋于稳定的趋势。ALT 和 AST 活力在 6 h 时达到最高点 ( $p<0.05$ ),在 48 h 后逐渐趋于稳定 ( $p>0.05$ ),此时两种酶活力的值均高于对照组。2010 年 Mari Yotsu-Yamashita 等<sup>[27]</sup>发现,可通过改变河豚鱼组织中钠离子通道的氨基酸序列进而提高机体对 TTX 的耐

受性。因此推测转氨酶活力的提高有利于河豚鱼体内蛋白质转化为游离氨基酸,从而与 LDH 共同提供河豚鱼转运河豚毒素所需的能量以及增加钠离子通道中氨基酸的丰富度。

### 2.4.3 不同时间下暗纹东方鲀肝脏中磷酸酶活力变化

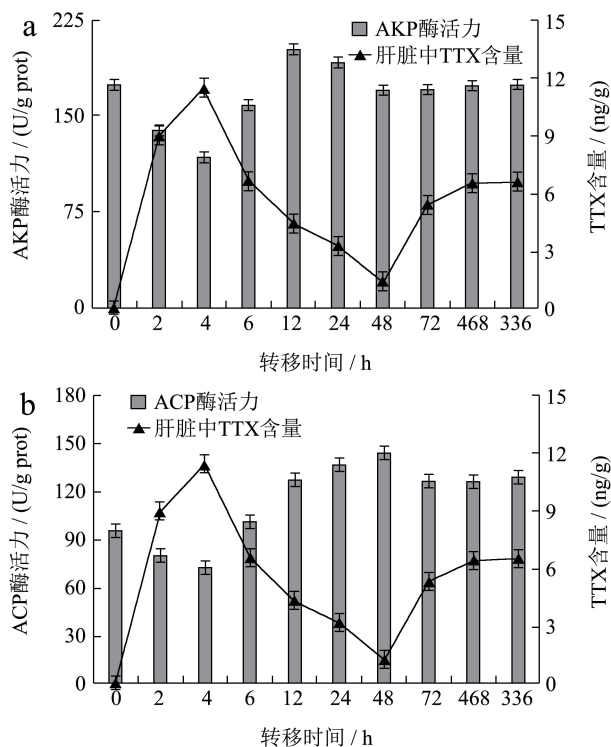


图5 灌喂 TTX 后不同时间下肝脏中 AKP (a) 和 ACP (b) 活力与 TTX 含量的变化

Fig.5 Changes of AKP (a) and ACP (b) activity and TTX content in the liver at different times after feeding TTX

肝脏中 TTX 含量及 AKP 和 ACP 酶活性随时间的变化趋向分别如图所示。相关分析得出,AKP 酶活力与 TTX 的含量的相关系数为 0.718,  $p=0.019$  ( $p<0.05$ ),说明两者之间显著相关。ACP 酶活力与 TTX 的含量的相关系数为 0.589,  $p=0.072$  ( $p>0.05$ ),说明两者之间相关不显著。

磷酸化和去磷酸化是生物机体新陈代谢的过程,其中磷酸酶是该反应不可或缺的催化剂,其中 AKP 和 ACP 同时是机体判断健康状态和免疫功能的重要参数。在本实验中,AKP 活力和 ACP 活性变化趋向相近,呈先下降后上升最终趋于稳定。AKP 和 ACP 活力在 4 h 时降至最低水平 ( $p<0.05$ ),表明大量 TTX 的灌喂引起了暗纹东方鲀的应激反应,降低了鱼体的免疫力。随后,AKP 和 ACP 活力逐渐上升,分别在 12 h 和 48 h 时达到最高点 ( $p<0.05$ ),在此过程中磷酸酶活力增加以增强河豚鱼免疫防御能力,从而降低 TTX 对机体免疫系统的破坏。Takuya Matsumoto 等<sup>[28]</sup>

通过抑制性消减杂交技术检测出河豚鱼经肌肉注射后肝脏组织中在免疫因子表达上调,该实验结果证实了本实验的可能性。最后 AKP 和 ACP 分别在 48 h 和 72 h 后逐渐趋于稳定 ( $p>0.05$ )。

### 3 结论

实验以暗纹东方鲀为研究对象,采用口服灌喂河豚毒素的给药方式,结合超高效液相色谱串联质谱法分析河豚毒素在不同组织器官中的转移分布规律,并同时对比分析肝脏组织中代谢酶活力的差异来探讨河豚毒素的耐受机制。结果表明,性腺是河豚毒素首要蓄积器官,肝脏是第二蓄积器官且与肾脏、脾脏、胆同时参与河豚毒素的转移代谢,皮肤和血液是参与河豚毒素的转运分布的主要组织,鳃是河豚毒素主要的排泄器官,肠道是河豚毒素的直接接触的器官。同时河豚鱼可通过提高肝脏中乳酸脱氢酶、转氨酶活性和调整不同时间下磷酸代谢酶活性,共同应对河豚毒素对机体的损伤。

### 参考文献

- [1] Chau R, Kalaitzis J A, Neilan B A. On the origins and biosynthesis of tetrodotoxin [J]. *Aquat Toxicol*, 2011, 104(1-2): 61-72
- [2] Woodward R B, Gougoutas J Z. The structure of tetrodotoxin [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1964, 86(22): 5030-5030
- [3] Su X, Castle N A, Antonio B, et al. The effect of kappa-opioid receptor agonists on tetrodotoxin-resistant sodium channels in primary sensory neurons [J]. *Anesth Analg*, 2009, 109(2): 632-640
- [4] Noguchi T, Ebesu J S M. Puffer poisoning: epidemiology and treatment [J]. *Toxin Reviews*, 2001, 20(1): 1-10
- [5] Hwang D F, Noguchi T. Tetrodotoxin poisoning [J]. *Advances in Food and Nutrition Research*, 2007, 52: 141-236
- [6] How C-K, Chern C-H, Huang Y-C, et al. Tetrodotoxin poisoning [J]. *The American Journal of Emergency Medicine*, 2003, 21(1): 51-54
- [7] Brillantes S, Samosorn W, Faknoi S, et al. Toxicity of puffers landed and marketed in Thailand [J]. *Fisheries Science*, 2003, 69(6): 1224-1230
- [8] Silva C C P, Zannin M, Rodrigues D S, et al. Clinical and epidemiological study of 27 poisonings caused by ingesting puffer fish (Tetrodontidae) in the states of Santa Catarina and Bahia, Brazil [J]. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 2010, 52(1): 51-56
- [9] Yasumoto T, Yotsu-Yamashita M. Chemical and etiological studies on tetrodotoxin and its analogs [J]. *Journal of Toxicology Toxin Reviews*, 1996, 15(2): 81-90
- [10] Noguchi T, Narita H, Maruyama J, et al. Tetrodotoxin in the Starfish *Astropecten polyacanthus*, in Association with Toxicification of a Trumpet Shell, "Boshubora" *Charonia sauliae* [J]. *Nihon-suisan-gakkai-shi*, 1982, 48(8): 1173-1177
- [11] Matsui T, Hamada S, Konosu S. Difference in accumulation of puffer fish toxin and crystalline tetrodotoxin in the puffer fish, *Fugu rubripes* [J]. *Nsugaf*, 1981, 47(4): 535-537
- [12] Yamamori K, Kono M, Furukawa K, et al. The toxicification of juvenile cultured kusafugu *Takifugu niphobles* by oral administration of crystalline tetrodotoxin [J]. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 2004, 45(2): 73-75
- [13] Honda S, Arakawa O, Takatani T, et al. Toxicification of cultured puffer fish *Takifugu rubripes* by feeding on tetrodotoxin-containing diet [J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 2005, 71(5): 815-820
- [14] Kono M, Matsui T, Furukawa K, et al. Accumulation of tetrodotoxin and 4,9-anhydrotetrodotoxin in cultured juvenile kusafugu *Fugu niphobles* by dietary administration of natural toxic komonfugu *Fugu poecilonotus* liver [J]. *Toxicon*, 2008, 51(7): 1269-1273
- [15] Pipe R K. Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *mytilusedulis* [J]. *The Histochemical Journal*, 1990, 11(22): 596-603
- [16] Samsonova M V, Min'kova N O, Lapteva T I, et al. Aspartate and alanine aminotransferases in early development of the keta [J]. *Russian Journal of Developmental Biology*, 2003, 34(1): 14-18
- [17] Fantin V R, St-Pierre J, Leder P. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance [J]. *Cancer Cell*, 2006, 9(6): 425-434
- [18] Noguchi T, Arakawa O. Tetrodotoxin-distribution and accumulation in aquatic organisms, and cases of human intoxication [J]. *Marine Drugs*, 2008, 6(2): 220-242
- [19] Qinhuai X, Kai H, Lisha G, et al. Toxicity of tetrodotoxin towards mice and rabbits [J]. *Journal of Hygiene Research*, 2003, 32(4): 371-374
- [20] Gao W, Kanahara Y, Yamada M, et al. Contrasting toxin selectivity between the marine pufferfish *Takifugu pardalis* and the freshwater pufferfish *Pao suvattii* [J]. *Toxins*, 2019, 11(8): 470-481

