

海洋有毒甲藻 *Coolia monotis* 的研究概况

Review of marine toxic dinoflagellate *Coolia monotis*

梁计林^{1,2}, 龙丽娟¹

(1. 中国科学院 南海海洋研究所 广东省海洋药物重点实验室, 广东 广州 510301; 2. 海南省海洋监测预报中心, 海南 海口 570206)

中图分类号: Q178.53

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2012)01-0139-04

甲藻(*Pyrrophyta*)又称双鞭毛藻(*Dinoflagellates*), 是海洋浮游植物的重要种群之一, 其种类繁多, 全世界已记录的约有 130 个属, 1200 个代表种。随着赤潮的频繁出现及赤潮毒素的强效活性的发现, 有毒甲藻的危害及医药作用日益引起人们的重视。赤潮毒素是海洋生物活性物质中研究、开发进展最为迅速的领域之一。本文以南中国海常见的一种海洋附生有毒甲藻 *Coolia monotis* 为论述对象, 从分类学、生理学和化合物研究 3 个层次对其进行综述。

1 分类学研究

Coolia 是甲藻门的一个属, 1919 年由 Meunier 确立, 中国内地未定其中文名, 中国台湾地区用库里亚藻称之。迄今共报道共有 3 个种, 分别为 *Coolia monotis* Meunier、*Coolia tropicalis* Faust 以及 2000 年由 Ten-Hage 宣布发现的印度洋新种 *Coolia areolata* Ten-Hage。*C.monotis* 是棕黄色近圆形单胞藻, 具两条鞭毛, 为光合自养型, 叶绿体呈圆盘状, 个体直径大小 25 ~ 50 μm。

由于 *C.monotis* 在形态上与其他一些藻类很相似, 其分类地位的确定曾出现过反复^[1-2]。Ehrenberg 和 Schimdt 分别在 1837 年和 1901 年用光学显微镜观察, 将其归入 *Glenodinium* 属和 *Ostreopsis* 属。1919 年, Meunier 则根据甲片排列形式把其从 *Ostreopsis* 属中独立出来, 单独成立为 *Coolia* 属。1937 年 Schiller^[3] 发现 *C.monotis* 的上壳甲片结构与 *Ostreopsis* 属极相似, 将其又归 *Ostreopsis* 属中。一直到了 20 世纪 80 年代, Steinta 提出以甲片排列形式作为多甲藻目分类的依据, 大家的意见才开始趋于一致。

扫描电镜(SEM)是现代显微观测的有效手段, 它可以清楚地观察到 *C.monotis* 的壳板组成和壳上的

小孔。借助 SEM, 多位科学家^[4-5]对 *C. monotis* 的分类地位进行了重新认定。1992, Faust^[6]利用 SEM 对 *C. monotis* 的形态进行观察, 从甲片的排列形式上鉴定此种, 并详细描述了此种的形态结构, 将其划入 *Coolia* 属中。1997, Rhodes 等^[7]对于澳大利亚海域采集的 *Coolia* 进行 SEM 观察。发现分离出的 *Coolia* 个体较 Faust 描述的 *C. monotis* 要小些, 而与 *C.tropicalis* 相近, 但经过壳板尤其是上甲壳甲板的对比从而确定为 *C. monotis*。

2 生理生态学研究

C.monotis 是广温广盐种, 世界范围内的热带、亚热带海域多有分布, 生活在近岸浅海。有实验证明 *C.monotis* 能在盐度 15 ~ 60 的环境中存活^[8], 温度 16 ~ 32 °C 间仍能生长^[9]。*C.monotis* 具有浮游、底栖、附生 3 种生活形态。*C.monotis* 细胞底部的小孔能分泌黏液^[6], 用以附着在大型藻体上, 群体在水体中分泌的这些黏液通常黏连成网状, 蔓布在海草间^[10]。

Faust^[6]用干涉对比的方法在光学显微镜下对实验室培养的 *C.monotis* 进行了生活状态的观察, 发现 *C.monotis* 存在无性生殖和有性生殖两种繁殖方式。据一些学者^[11-12]的观点, 海藻在营养条件良好时主要以前者为主要繁殖方式, 当培养条件发生变化——通常是养分损耗的时候, 又尤其是氮含量降低的情况下会诱发有性生殖。*C.monotis* 的有性生殖

收稿日期: 2010-09-12; 修回日期: 2010-12-10

基金项目: 中国科学院知识创新工程项目(KSCX2-YW-R-093); 广东省科技攻关项目(2002A3050502)(2005B60301032)

作者简介: 梁计林(1981-), 男(壮族), 广西柳州人, 博士, 工程师, 专业为海洋调查与监测, 电话: 0898-68966795, E-mail: jinn77@163.com; 龙丽娟, 通信作者, E-mail: longlj@scsio.ac.cn

在其天然栖息地——红树林海域曾被观察到，那里的沉积物中氮含量比较低，约为 5mg/g^[13]。除营养盐浓度因素外，其他因素也是发生有性生殖的诱发原因。在诱发有性生殖的实验中，Faust^[6]采用了较野外水温 24~32.5 低的 23；光暗周期也由野外的 13h:11h 变为 10h:14h；盐度则由野外 33~38 固定为 36；光照强度则降低至 1 900~5 700 lx，低于野外的 9 500~12 000 lx。*C.monotis* 的无性生殖为等二分分裂，有性生殖以同配生殖方式进行。

对于 *C.monotis* 的实验室培养，各个实验室根据实验目的的不同选择了不同的培养条件，其中多数的培养目的是用于动物实验以测定其是否具有毒性，尚未有过全面综合的最适培养条件及最大培养密度测定。这些实验中采用的培养基有 ES-1、GP 以及 f/2 等^[6,14]。温度、光照等其他条件根据各自实验情况的不同在 *C.monotis* 的存活范围内选择。从培养的结果比较来看，刘宁宁等^[9]进行的单因子生长条件实验在 28、盐度 34、光暗周期 12h:12h、光照强度约 2 000 lx，使用 2 倍改良 K 培养液条件下，获得了最大的细胞密度，为 6×10^4 个/mL，这是迄今为止有报道的最大培养密度。

3 化合物研究

海洋甲藻通常具毒性，被认为是造成有害赤潮的元凶，但随着赤潮毒素的强效活性的发现，有毒甲藻的医药作用日益引起人们的重视。因此从甲藻中分离出毒素，测定其分子结构并进行药理、药化研究以阐明其致毒机理，在充分了解其构效关系的基础上将其作为模型化合物进行辅助基团改造等化学修饰，以期在确保疗效的基础上降低毒性，已成为研究毒素类海洋治疗药物的常规途径。近十多年来，各国学者对各种毒素的来源、类型、化学结构以及作用机制作了大量研究，取得了可喜的进展。从目前的研究进展来看，甲藻毒素在研究癌症机理和开发抗癌、镇痛、麻醉、抗病毒、抗菌等各种治疗药方面有着非常广阔的应用前景。此外，甲藻毒素作为药理研究工具药的应用前景也非常广阔。

20 世纪 90 年代之前 *C.monotis* 都被认为是不产生毒素的，然而 1995 年澳大利亚科学家 Holmes 等^[15,16]发表的论文指出，他们从澳大利亚海域分离出的 *C.monotis* 中发现一分子量为 1062 的钠盐具有毒性，命名为 *Cooliatoxin*。对小鼠进行腹腔注射，

LD₅₀ 为 1mg/kg，中毒症状为先经过一个未见中毒症状的延迟期，然后出现体温下降并且呼吸衰竭。然而这种中毒现象并未在当时已证实的鱼类毒素中发现，可以认为 *Cooliatoxin* 不会通过在鱼体内的积累而致人中毒。

Rhodes 等^[14,17-18]对 *C.monotis* 进行了一系列形态、毒性方面的研究。通过 FITC 标记血凝素检验 (FITC-conjugated lectins) 发现 *C.monotis* 能与 *Canavalia ensiformis* 和 *Helix pomatia* 结合，但不能与 *Erythrina cristagalli* 结合，推断出 *C.monotis* 能产生 N-乙酰基-D-半乳糖氨，而不含 -乳糖。而与 *C.ensiformis* 的结合则可以证明其中含有甘露糖、葡萄糖、吡喃甘露糖中的一种或几种。在卤虫 (*Artemia salina*) 的培养中加入 *C.monotis*，结果表明 *C.monotis* 能引起 *A.salina* 形态变异而非致死。他们进行的毒性实验证实不同品系的 *C.monotis* 其提取物对小鼠的致死效力不同，4 个实验品系中有一个在 220 s 使小鼠致死，死亡征兆与一种叫做 Rangaunu Harbour Toxin (RHT) 的毒素致死征兆相似 (此毒素在利玛原甲藻 *Prorocentrum.lima* 中存在)，而其他 3 个品系却对小鼠无致死效力。另外，实验中 *C.monotis* 的提取物在成神经细胞瘤 (neuroblastoma) 测定中能激活钠离子通道。实验所用的 4 个 *C.monotis* 品系中，均未发现 Holmes^[16]报道的毒素 *Cooliatoxin*。但 Rhodes 在实验的 4 个品系中的一个品系中发现有未知的聚醚类类似物，另有一个品系的提取物具细胞毒性。他们的实验还检测出提取物有低水平的溶血活性，但量太少还不足以确定是否是具溶血活性的沙海葵毒素 (palytoxin, PTX)。

微藻常暴露在日照下受氧气包围，但却含有丰富的不饱和脂肪酸而不被氧化，这个特性也引起了科学家们的兴趣。20 世纪 90 年代中期，日本科学家 Nakagawa, Murata 等^[19]试图从 *C.monotis* 中寻找能清除自由基的活性物质。他们把 *C.monotis* 的提取物加入被氧化了的大鼠肺部微体脂肪，以评估 *C.monotis* 所含化合物的抗氧化能力，但实验结果表明其提取物并未表现出很强的抗氧化能力。同时他们还用 P388 小鼠白血病细胞进行筛选实验，加入 *Coolia monotis* 提取物以观察存活率。在选用的 4 个 *C.monotis* 品系中，两个表现出了很强的毒性而另两个的毒性则不很明显。

对于 *C.monotis* 合成的化合物，Tanaka, Matsuoka 等^[20]用 2D 核磁、手性 HPLC 及 CD 的方法进行分析。

在提取物中发现两种化合物：一种是新发现的化合物，一种未知的神经酰胺(图 1)，此神经酰胺在当时已发现的天然产物中是首次发现 18 碳脂肪酸在 C₁₅ 位上有甲基取代。另一个是海藻中常见的二酰基半乳糖甘油酯(diacylgalactosyl-glycerolipid, 图 2)。

2000 年, Akasaka 等^[21]对上述的神经酰胺进行了进一步的研究, 利用反向 HPLC 等方法确定了此化合物手性中心的绝对构像为 R。

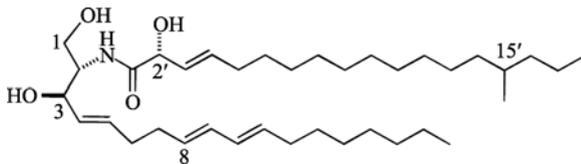


图 1 带新颖支链的脂肪酸

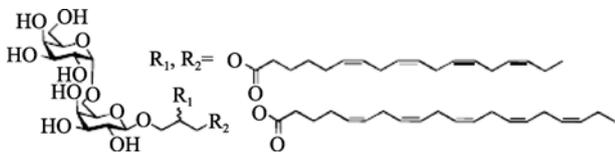


图 2 二酰基半乳糖甘油酯

2000 年, 德国科学家 Perovic 等^[22]在嗜铬细胞瘤细胞(PC12)和初级神经元(Primary neuron)的培养中加入 *C.monotis* 离心后的上清液。结果未发现这两种细胞有明显死亡现象, 证明 *C.monotis* 对其不具有毒害作用, 不影响神经细胞和突触的自由钙离子水平, 对两种细胞的生长发育也无明显影响。

4 结语

C.monotis 是分布范围较广的甲藻, 各国科学家对其进行了不同层次上的研究, 但由于在自然条件下, *C.monotis* 数量通常较少, 在适宜生长季节一般也只占采样所得甲藻数量的 5% 以下, 而且在甲藻中属于较难培养种, 因而远远不能满足科学研究和实际利用的需要。据 1995 年的统计, 世界范围内仅有包括澳大利亚、新西兰等 4 个国家的 5 个实验室分别存有 *C.monotis* 的 9 个培养株^[23]。由于原材料较难获得的制约, 目前国内外对于 *C.monotis* 的研究相对较少, 国外仅有数量有限的几篇报道, 对其次生代谢产物的结构、生物活性等方面的了解却还尚未深入、知之甚少。国内仅有对其形态及培养条件方面的研究, 尚未开展对其化合物方面进行探讨的工作。

C.monotis 在我国广东、海南沿海均有分布, 中

国科学院南海海洋研究所于 1999 年首次正式报道在南中国海发现 *C.monotis*, 并且分离纯化获得藻株, 并攻克了该种难保种难培养的瓶颈问题, 成为目前国内唯一一家存有该藻种的单位。目前仅对其形态及培养条件进行了初步的研究, 尚未开展对其化合物成分及毒素成分进行探讨的工作, 至于该南中国海地理品系是否为有毒种, 则需要通过一系列的试验才能证实。因此, 深入研究 *C.monotis* 的生长特性、次生代谢产物结构、生物活性等, 对进一步开发利用海洋资源, 造福人类有着非常重要的科学意义和现实意义。

参考文献:

- [1] Karen A, Steidinger K J. Dinoflagellates[C]//Tomas C R. Identifying marine diatoms and dinoflagellates. New York: Academy Press, 1996: 387-598.
- [2] 刘宁宁, 林永水. 有毒甲藻 *Coolia monotis* Meunier 的研究[J]. 热带海洋, 1999, 18(2): 1-4.
- [3] Schiller J. Dinoflagellate(Peridinea)[C]//Rabenhorsts L. Kryptogamen-flora von D, Schweiz O. Leipzig: Akademische Verlagsges Press, 1937: 589.
- [4] Yasumoto F, Oshima Y, Murakaru Y, et al. Toxicity of benthic dinoflagellates found in coral reef[J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1980, 46(3): 327-330.
- [5] Besada E G, Loeblich L A. Observations on tropical benthic dinoflagellates from ciguatera endemic area: *Coolia monotis*, *Gamierdiscus* and *Ostreopsis*[J]. Bull Mar Sci, 1982, 32(3): 723-735.
- [6] Faust M A. Observations on the morphology and sexual reproduction of *Coolia monotis*(Dinophyceae)[J]. J Phycol, 1992, 2(10): 94-104.
- [7] Rhodes L L, Thomas A E. *Coolia monotis* (Dinophyceae): a toxic epiphytic microalgal species found in New Zealand[J]. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research, 1997, 31: 139-141.
- [8] Pincemin J M. Influence of salinity on the dinoflagellate *Glenodinium monotis*[J]. Océanogr Médicale, 1972, 25: 71-87.
- [9] 刘宁宁, 林永水, 段舜山. 海洋有毒甲藻 *Coolia monotis* 的研究 II [J]. 热带海洋学报, 2002, 21(1): 64-69.

- [10] Hargraves P E, Lucie M. Potentially toxic or harmful microalgae from the northeast coast[J]. *Northeastern Naturalist*, 2002, 9(1): 81-120.
- [11] Pfiester L A. Sexual reproduction of *Peridinium cinctum* f. *ovoplanum*(dinophyceae) [J]. *J phycol.* 1975, 11: 259-265.
- [12] Anderson D M, Kulis D M, Binder B J. Sexuality and cyst formation in the dinoflagellate *Gonyaulax tamarisensis*: cyst yield in batch cultures[J]. *J Phycol.* 1984, 20: 418-425.
- [13] Leichtfried M. Distribution and quality of POM in mangrove and reef sediments[C]//Ruetzler K. A mangrove ecosystem: Twin Cays, Belize. Report from a Smithsonian Institution Workshop held at Solomons. Maryland, 1988: 15-16.
- [14] Rhodes L L, Janet A, Suzuki T, et al. Toxic marine epiphytic dinoflagellates, *Ostreopsis siamensis* and *Coolia monotis* (Dinophyceae) in New Zealand[J]. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 2000, 34: 371-383.
- [15] Holmes M J. Strain-dependent production of toxins by benthic dinoflagellates[J]. *Toxicon*, 1996, 34(3): 309-310.
- [16] Holmes M J, Lewis R J, Jones A, et al. *Cooliatoxin*, the first toxin from *Coolia monotis* (Dinophyceae)[J]. *Nat Toxins*, 1995, 3(5): 355-62.
- [17] Rhodes L L, Haywood A J, Fountain D W. FITC-conjugated lectins as a tool for differentiating between toxic and non-toxic marine dinoflagellates[J]. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 1995, 29: 359-365.
- [18] Rhodes L L, Syhre M. Okadaic acid production by a New Zealand *Prorocentrum lima* isolate[J]. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 1995, 29: 367-370.
- [19] Nakagawa H, Murata M, Tachibana K, et al. Screening of epiphytic dinoflagellates for radical scavenging and cytotoxic activities[J]. *Phycological Research*, 1998,46:9-12.
- [20] Tanaka I, Matsuoka S, Murata M, et al. A new ceramide with a novel branched-chain fatty acid isolated from the epiphytic dinoflagellate *Coolia monotis*[J]. *J Nat Prod.* 1998, 61: 685-688.
- [21] Akasaka K, Shichijyukari S, Matsuroka S. Absolute configuration of a ceramide with a novel branched-chain fatty acid isolated from the epiphytic dinoflagellate, *Coolia monotis*[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, 64(9): 1842-1846.
- [22] Perovic S, Tretter L, Brümmer F. Dinoflagellates from marine algal blooms produce neurotoxic compounds: effects on free calcium levels in neuronal cells and synaptosomes[J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2000, 8: 83-94.
- [23] 林永水, 邱德全, 周近明等. 热带海域有毒微藻研究[C]//海南岛海洋生态及环境学术讨论会论文集.香港: 香港科技大学出版社, 1996: 77-81.

(本文编辑: 张培新)