

拟菱形藻软骨藻酸研究进展 *

PROGRESS IN THE STUDY OF DOMOIC ACID FROM *Pseudo-nitzschia*

虞秋波 高亚辉 **

(厦门大学生命科学学院 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室 厦门 361005)

中图分类号 Q946.8 文献标识码 A 文章编号 1000-3096(2003)08-0026-04

1 危害事件的回顾

至今,已发生了多起因海洋拟菱形藻(*Pseudo-nitzschia* spp.)赤潮产生软骨藻酸而引起的中毒事件。首次有记录的是1987年在加拿大爱德华王子岛的东海岸发生的因食用紫贻贝而造成中毒死亡事件。当时有100多人中毒,3人死亡。中毒者症状奇特,主要表现为腹痛、腹泻、呕吐,并伴有记忆丧失、意识混乱、不能辨认家人及亲朋好友等严重精神症状,严重者陷于昏睡状态,其中12人病愈后记忆丧失长达18个月之久,因此称之为记忆丧失性贝类中毒(Amnestic Shellfish Poisoning, ASP)。后经加拿大国立大海洋研究中心的专家们鉴定,发现中毒物质为软骨藻

酸(Domoic acid),并发现该物质来源于经常在加拿大东海岸形成赤潮的一种硅藻多列拟菱形藻(*Pseudo-nitzschia multiseries*)^[1]。

从此以后,在加拿大、美国海岸拟菱形藻赤潮产生软骨藻酸而引起危害事件不断被报道。1989年,在

* 国家重点基础研究规划 973 项目 2001CB409701 号。

第一作者:虞秋波,出生于1980年,在读硕士研究生,主要从事硅藻的分类和生态研究,通信地址:厦门大学生命科学学院硅藻研究室,E-mail:yuqiubo@163.net

** 通讯作者。

收稿日期:2002-08-30;修回日期:2002-10-28

加拿大东部的 Fundy 海岸, 从贻贝中检测出软骨藻酸, 此次是由伪优美拟菱形藻 (*Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima*) 产生的。1991 年, 美国的太平洋海岸第一次爆发了有毒拟菱形藻赤潮。在加利福尼亚的蒙特利有 100 多只褐色鸕鹚和鸕鹚吃了蓄积有软骨藻酸的凤尾鱼而死亡。此次是由澳洲拟菱形藻 (*Pseudo-nitzschia australis*) 产生的。1991~1994 年, 太平洋海岸经常爆发由澳洲拟菱形藻形成的赤潮。1996 年, 在墨西哥的 Baja, 软骨藻酸又大量地出现在螃蟹、凤尾鱼、沙丁鱼中, 并造成成百上千只海鸟中毒死亡。1998 年 5、6 月, 在加利福尼亚海岸漂浮着 400 多头海狮, 打捞上来时仅 70 头活着, 但其中的 47 头后来因神经中毒而死亡。毒源藻也是澳洲拟菱形藻。2000 年 9 月, 加拿大爱德华王子岛西海岸的一些海产品被禁止捕捞, 因为贻贝中软骨藻酸的含量高达 33×10^{-6} g/g 鲜贝肉质量, 超过了可食部软骨藻酸的最高允许含量 20×10^{-6} g/g 鲜贝肉质量^[2]。

在我国, 梁松、钱宏林等于 1998 年报道了 1990 年 6 月 10 日大鹏湾爆发过尖刺拟菱形藻赤潮。吕颂辉、齐雨藻在 1990~1992 年对大鹏湾进行的赤潮生态研究中发现, 尖刺拟菱形藻 (*Pseudo-nitzschia pungens*) 和优美拟菱形藻 (*Pseudo-nitzschia delicatissima*) 是硅藻类中的优势种, 而且尖刺拟菱形藻为最频繁爆发赤潮的种之一^[3]。在我国, 至今还没有因拟菱形藻赤潮而发生水生动物或人中毒事件的报道。

2 拟菱形藻的介绍

拟菱形藻是一种在全球近海岸分布极广的羽纹纲硅藻。单个生活或相连成丝状。它们都有两个硅质壳。壳面狭舟形至舟形。船骨点不明显, 也无横肋。细胞内和细胞外环境主要通过硅质壳上的孔纹来进行交换。这些孔纹是区分拟菱形藻属各个种的重要特征。它们一般呈金黄色, 因为它们的色素主要是墨角藻黄素 (fucoxanthin)。

拟菱形藻进行无性生殖时, 每个子细胞从母细胞中接受一个壳作为上壳, 自己再合成一个下壳。这样, 细胞会越来越小。当细胞变为原来母细胞的约 30% 大小时, 就进行有性生殖以恢复细胞的大小。当水体中有很多细胞时, 因为有很高的相遇机会使得有性生殖非常方便。有性生殖经常发生于赤潮爆发时, 因为由有性生殖产生新细胞的速度远比由无性生殖产生新细胞的速度快。有性生殖产生的大、新的细胞产软骨藻酸比小、老的细胞产软骨藻酸多^[2]。

较高的温度、较低的盐度、平静的海面是大多数赤潮藻发生赤潮的理想环境, 但这对拟菱形藻不适

用。它们往往在温度降低时发生赤潮, 那时其他浮游植物比如甲藻失去了与之竞争的能力。温度降低时, 会使海水进行垂直交换, 从而给赤潮藻的生长带来丰富的营养物质, 而且, 因为拟菱形藻是硅藻, 易下沉, 不断在进行垂直交换的海水使得藻细胞能一直浮在透光层^[2]。广盐性的特点使得它们能在河口等盐度变化较大的环境中生长。当近岸受生活和工业废水污染时, 改变了海水中的 N:P:Si 比例, 使得拟菱形藻赤潮有可能发生。

目前发现能产生软骨藻酸的拟菱形藻有以下几种: 尖刺拟菱形藻多列变种 (*Pseudo-nitzschia pungens forma multiseries*)、伪优美拟菱形藻 (*Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima*)、澳洲拟菱形藻 (*Pseudo-nitzschia australis*)、成列拟菱形藻 (*Pseudo-nitzschia seriata*)^[4]。

张诚、邹景忠曾对中国近海尖刺拟菱形藻种下分类做了初步研究, 将其分为两个型: 尖刺型 (*f. pungens*) 和多列型 (*f. multiseries*)。前者不产毒, 后者产毒。但我国具体有多少个有毒种或变种, 还需要进一步广泛深入的调查研究。

3 软骨藻酸的产生和积累

软骨藻酸被认为是当细胞不能很好生长时, 用来消除过多的光合作用产生的能量。这与 Pan 等^[5]的假设相符: 当光合磷酸化的高能中间产物 ATP 和 NADPH 并不用在初级新陈代谢时, 软骨藻酸就释放了出来。细胞分裂和硅的吸收是在白天进行的, 当光减弱时, 细胞分裂也减慢, 因为硅的消耗引发了软骨藻酸的产生^[2]。Pan 等^[6]还认为, 缺磷会触发软骨藻酸的产生, 但现在其机理还不清楚。Bates 等^[7]认为, 氮不仅是藻细胞生长的必需元素, 同时还是软骨藻酸合成的必需元素。软骨藻酸可能是微量金属元素 (如铁、铜) 的螯合物, 所以它的产生可能和海水中的铁和铜离子的浓度密切相关^[8]。培养于缺铁环境中的 *P. multiseries* 被认为产生软骨藻酸的量比铁充足环境中来的多, 而铜的情况刚好相反^[2]。MacPheeet 等^[9]指出, 目前还不清楚拟菱形藻内是否有胞内细菌存在。如果存在的话, 胞内细菌是否对软骨藻酸的产生起作用也不清楚。而拟菱形藻细胞外的细菌能促进软骨藻酸的产生。Bates 等 1995 年发现, 经抗生素处理得到的几株可产记忆缺失性贝毒中软骨藻酸的无菌尖刺拟菱形藻 (*P. pungens f. multiseries*), 同其自然带菌时相比, 虽然藻细胞生长基本正常, 但产毒能力却下降为原来的 1/8~1/10。当将来于此有毒硅藻培养液中细菌菌株加入到该无菌藻中, 藻产毒量增长了 22~95 倍, 产毒量增长幅度同有毒藻本身密切相关, 而所

加入细菌不是决定性因素。除此之外,他们还发现,来自于无毒角毛藻 (*Chaetoceros* sp.) 培养液中的一株细菌也能增强该硅藻产软骨藻酸的能力,甚至可达 115 倍,这进一步说明,除了有毒藻类细菌外,其他来源的(无毒)细菌也能提高有毒藻产毒能力,抗生素不是使藻产毒能力下降的直接原因(但抗生素可以杀死那些可能影响藻产毒的细菌,具有间接效应)。

众所周知,粘土可以治理赤潮,有实验证明尖刺拟菱形藻的最大生长速率随粘土浓度的增加而降低。软骨藻酸产生量也是随粘土浓度增加而降低。在细胞生长的静止期,软骨藻酸的浓度急剧增加。可能是因为藻细胞处在低代谢能力状态下,软骨藻酸由其他氨基酸化合物转化而来,所以软骨藻酸是在细胞生长后期产生的^[10]。

水中的贝类和鱼类都可以富集藻类产生的软骨藻酸,并对软骨藻酸有较强的耐受力,再经食物链传递则会对所在地区的生态环境造成影响,对水生动物及人类的健康造成极大危害。

软骨藻酸在水生生物体内的积累量因不同季节、不同部位而有所不同。Wekell 等于 1991~1993 年对不同季节的蛤蜊及其不同部位进行软骨藻酸含量测定,发现其可食用部分软骨藻酸含量 12 月份最高,平均可达 106 mg/kg,此后逐渐下降。但在浓度达到高峰后 16 个月,蛤蜊体内的软骨藻酸仍不能完全消失。此外,蛤蜊的各个部位均能检测出软骨藻酸,其中足部浓度最高,可达 223 mg/kg;虹吸管部位的浓度最低。在贻贝中仅内脏中检出软骨藻酸^[11]。

4 软骨藻酸的理化性质和毒性机理

软骨藻酸分子式 $C_{15}H_{21}NO_6$, 分子量 311.34, 结构式如图 1, 是一种兴奋性脯氨酸衍生物和神经毒素。结构与红藻氨酸 (Kainic acid) 和谷氨酸相似。但作为神经兴奋物质其效力比红藻氨酸高 2~3 倍, 比谷氨酸高 100 多倍。近年来从某些藻类中相继分离出软骨藻酸的同族化合物异软骨藻酸 A、B、C、D、E 和 F 以及降软骨藻酸, 这些在结构上虽类似, 但毒力都比软骨藻酸弱^[4]。

软骨藻酸纯品为白色固体粉末, 熔点为 223~224 °C, 溶于水 (8 mg/mL), 微溶于甲醇 (0.6 mg/L), 在紫外光谱区最大吸收波长为 242 nm。在体积比为 1:9 的乙腈/水的溶液中和 -12 °C、黑暗条件下, 可 1 年左右保持稳定^[4]。

水生动物(尤其是贝类)能富集软骨藻酸,但同时它们具有很强的耐受力,而食用这些水生动物的鸟类、海洋哺乳类动物或人类则会引起不同程度的中毒

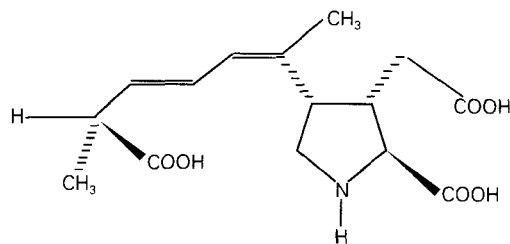


图 1 软骨藻酸的结构

症状。当人摄入软骨藻酸污染的海产品后,在 24 h 内会出现恶心、头痛、腹泻或腹部痉挛等胃肠道症状。在 48 h 内,至少会出现一种或多种神经性障碍如神志不清、方位不辨、记忆力丧失或心脏病发作、昏迷甚至死亡的严重症状^[4]。

动物实验表明:软骨藻酸对内脏功能有关的脑干区域具有兴奋作用,而对与记忆有关的脑区域具有明显的神经毒性作用^[12]。而从人类中毒死亡者的病理解剖可见脑的海马回、丘脑和杏仁核都有损伤,这与用软骨藻酸进行动物试验的病理结果相同^[1]。Wang 等 2000 年进行大鼠皮下注射软骨藻酸试验,研究结果显示所观察到的小鼠麻痹、震颤等行为变化主要是由脊髓损伤而非脑损伤引起,使得软骨藻酸引起脊髓的损害也受到重视。

软骨藻酸的毒性作用被认为与多巴胺和 γ -氨基丁酸有关,可抑制大鼠脑膜中腺苷酸环化酶的活性。Arias 等应用微分析技术检测软骨藻酸对纹状体多巴胺活性的影响,结果表明脑内给予不同剂量的软骨藻酸可使大鼠纹状体细胞外多巴胺水平增加及细胞外多巴胺代谢产物降低^[10]。随着人们对软骨藻酸的关注日益增加,软骨藻酸的毒性机理的研究也逐渐深入。软骨藻酸对海马区 and 大脑新皮层神经元的损伤,其毒性作用途径主要被认为是通过 2 种亚型谷氨酸受体即 NMDA 型和 KA/AMPA 型受体发挥作用的。软骨藻酸通过不同的作用机制激活 NMDA 受体和 KA/AMPA 受体,对机体产生神经兴奋性损害,特别是引起细胞内 Ca^{2+} 过负载,造成细胞损伤,一方面可引起 AMPA 受体和磷酸化,提高其对软骨藻酸的敏感性,但另一方面又可以诱导 γ -氨基丁酸的释放,对软骨藻酸的兴奋作用进行抑制^[11]。Seeward 等 1990 年和 Hampson 等 1992 年还认为,软骨藻酸的毒效反应终止于线粒体水平,认为由于线粒体的氧化磷酸化的去耦合降低了引起细胞胀大并最终胞溶的膜的通透性,从而减少并阻止胞溶现象进一步发生^[4]。

目前,软骨藻酸与谷氨酸亚型受体的结合方式及具体的作用机制还不清楚,受体激活后引起的各种细胞内反应也有待进一步研究。

5 软骨藻酸的分析法

目前,对软骨藻酸的分析方法,主要是化学分析法。其中高效液相色谱法(HPLC)被公认为是检测软骨藻酸的最有效方法。Usagawa等^[9]认为HPLC不仅是毒素检测的有力工具,而且还是毒素标准品准备的必备工具。Takaeshi等^[13]认为,HPLC是新发现毒素进行LC/MS结构确定的辅助工具。该法已被澳洲规范为国家标准方法。加拿大、西班牙、澳大利亚、丹麦、新西兰和美国等国家均采用具体系统不尽相同的HPLC,监测浮游生物和贝类等代谢或蓄积的软骨藻酸。在所发表的有关文献中,Michael等人^[14]的方法论述的较详细,他们采用了AOAC中对PSP的规范方法提取ASP毒素,经SPE纯化后,利用一般C₁₈反相柱以乙腈-水-四氢呋喃作流动相,紫外检测器(UV)检测。此方法的检测极限为20 μg/kg,最低回收率为93%^[15]。

第二类为小鼠生物分析法。此法是根据美国公职化学家协会(AOAC)所标定的麻痹性贝毒素(PSP)的小鼠生物分析法加以改进的,即增加实验小鼠的数量,并延长观察时间。1994年, VanDolah等人还发展了受体生物分析法(Receptor Bioassay Method),此法可用于分析贝类、蟹类内脏中的软骨藻酸含量,其检测极限为0.001 μg/kg^[4]。

免疫方法因其具有快速、准确、便利等特点在其他贝毒素检测中得以广泛应用,但在软骨藻酸的分析中还没得以应用,因为其分子量太小,难以从中提取出稳定的免疫抗原^[16]。

6 展望

软骨藻酸作为一类神经毒素,会危害渔业、水产业经济的发展,影响人类的健康。近年来全球生态环境的不断恶化,使得赤潮频繁爆发;海上航运的全球化,使得软骨藻酸污染也不断扩大^[6],引起各国的重视。但国内对软骨藻酸及其拟菱形藻的研究很少,在我国拟菱形藻属有多少个种或变种及其地理分布、其中有无产毒的种或变种等方面还没人做过系统的调查研究,所以有必要对拟菱形藻的种类组成、生态分布及产毒机理等进行研究。

软骨藻酸作为海洋毒素的一类也是天然的产物,人们在预防它的毒性的同时,应充分利用其生物活

性。研究表明软骨藻酸对昆虫有杀灭能力,其对蟑螂、苍蝇的杀灭效果不逊于r-BHC。另外,它可以作为神经生理学研究的有用试剂^[4]。这些说明我们应该深入研究其特性,从而充分开发利用其潜在的应用价值。

参考文献

- 1 杨平,李秀兰.海洋藻类毒素性食物中毒的研究.中国食品卫生杂志,1998,10(1):34-39
- 2 Lizzy M. Domoic acid: a fascinating marine toxin. Environmental, Toxicology and Pharmacology, 2001(9): 79-85
- 3 吕颂辉,齐雨藻.南海大鹏湾的主要赤潮生物.暨南大学学报,1992,13(3):130-133
- 4 刘伟斌,杜琦.国外软骨藻酸的研究概况.海洋湖沼通报,1997(1):67-70
- 5 Pan Y, Bates S S, Cembella A D. Environmental stress and domoic acid production by *Pseudo-nitzschia*: a physiological perspective. Natural Toxins, 1998, 6: 127-135
- 6 Todd E C D. Domoic acid and amnesic shellfish poisoning- A review. J Food Protec, 1993, 56(1): 69-83
- 7 Bates S S, Garrison D L, Homer R A. Bloom dynamics and physiology of domoic acid-producing *Pseudo-nitzschia* species. In: Anderson D M, Cembella A D, Hallegraeff G M. Phyto-logical Ecology of Harmful Algal Blooms. Heidelberg: Springer-Verlag, 1998. 267-292
- 8 Eden R, Bruland K. Domoic acid binds iron and copper: a possible role for the toxin produced by the marine diatom *Pseudo-nitzschia*. Marine Chemistry, 2001, 76: 127-134
- 9 Usagawa T. Preparation of monoclonal antibodies against okadaic acid prepared from the sponge halichondria okadae. Toxicon, 1989, 27: 1 323
- 10 俞志明.粘土矿物对尖刺拟菱形藻多列型生长和藻毒素产生的影响.海洋与湖沼,1998,29(1):47-52
- 11 陈西平,王成斌.软骨藻酸和谷氨酸受体.卫生研究,2000,29(4):255-256
- 12 陈西平,刘江.水生态环境中神经毒性生物毒素——软骨藻酸.国外医学卫生学分册,2001,8(2):92-95
- 13 Takaeshi Y. Marine toxins. Chem Rev, 1993, 93: 1 897
- 14 Michael A Q. Rapid extraction and cleanup for liquid chromatographic determination of domoic acid in unsalted seafood. J AOAC, 1995, 78(2):543
- 15 刘宁,李春盛.海洋毒素的高效液相色谱分析.中国食品卫生杂志,1999,11(2):40-43
- 16 郭皓.免疫方法在藻毒素及贝毒素检测中的应用.卫生研究,1999,28(2):122-124

(本文编辑:刘珊珊)