

麻痹性贝毒毒素的应用研究进展^{*}

王云峰 于仁诚 李 钧 颜 天 付 萌 周名江
(中国科学院海洋研究所)

由于有害赤潮的发生日趋频繁,对养殖业、自然生态系统和人类健康的危害越来越大,造成的经济损失也逐渐增加,因而有害赤潮问题成为人们关注的焦点。藻毒素是有害赤潮致害的重要因子之一,而麻痹性贝毒(Paralytic Shellfish Poisoning, PSP)毒素又是藻毒素中分布最广、危害最大的一类毒素。随着科学家们对 PSP 毒素的来源(Steidinger, 1993)、结构和作用方式(Penzo et al., 1998)的深入研究, PSP 毒素在赤潮研究、分子生物学和神经生物学基础研究、医药、军事防化等的应用也逐渐受到重视。本文作者针对这些问题进行了综合评述,以期为进一步开展 PSP 毒素应用研究提供参考依据。

一、PSP 毒素的产生

目前已知能够产生 PSP 毒素的主要海藻有:非链状亚历山大藻(*Alexandrium acatenella*),链状亚历山大藻(*A. catenella*),股状亚历山大藻(*A. cohorticula*), *A. fundyense*, *A. lusitanicum*,微小亚历山大藻(*A. minutum*), *A. monilatum*, *A. ostentfeldii*,塔玛亚历山大藻(*A. tamarense*), *Gymnodinium catenatum*, *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* 等(Steidinger, 1993)。此外,细菌、蓝藻、红藻(*Jania* sp.)中的一些种类也可以产生 PSP 毒素。近几年在淡水蓝藻 *Cylindrospermopsis raciborskii* (Lagos et al., 1999), *Lyngbya wollei* (Onodera et al., 1997)中也发现了 PSP 毒素。

不同有毒藻所产生的 PSP 毒素种类和含量存在差异,而同一种有毒藻产生的毒素种类和含量在生物不同的生长阶段也有差别,同时毒素产生状况还受到生物因素(如细菌)和非生物因素(如光照、温度、盐度、营养盐等)的影响。

二、PSP 毒素的结构和类型

PSP 毒素是一类四氢嘌呤的衍生物(图 1)。现在已经发现的毒素有 20 余种,根据

^{*} 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 4366 号。

国家高技术研究与发展计划: 8638190605 号;国家自然科学基金重大项目: 39790110 号;国家自然科学基金项目: 40076030 号, 39950001 号。

收稿日期: 2001 年 6 月 18 日。

R4基团的不同可以分为四类(见表 1), 分别是氨基甲酸酯类毒素(Carbamate toxins), 包括: 石房蛤毒素(STX), 新石房蛤毒素(neoSTX), 膝沟藻毒素 1-4(GTX1-4); N-磺酰氨基酰基类毒素(N-sulfocarbamoyl toxins), 包括: B1-2, C1-4; 脱氨基酰基类毒素(decarbamoyl toxins), 包括: dc-STX, dcneoSTX, dcGTX1-4; 脱氧脱氨基酰基类毒素(deoxydecarbamoyl toxins), 包括: doSTX, doGTX2, 3。最近又在一种蟹 *Zosimus aeneus* 中检出了石房蛤毒素和新石房蛤毒素的 N-羟基衍生物(N-hydroxycarbamoyl derivatives)hySTX 和 hyneoSTX。

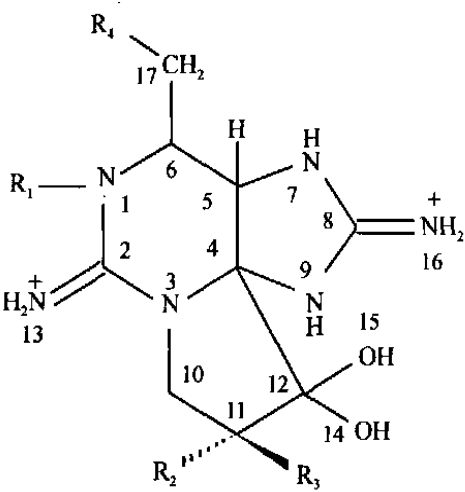


图 1 PSP 毒素的结构(Baden, 1983)

表 1 PSP 毒素种类与名称(R1、R2、R3、R4 为图 1 中 4 个取代基)(于仁诚、周名江, 1998)

R1	R2	R3	R4				
H	H	H	STX	GTX5(B1)	dcSTX	hySTX	doSTX
OH	H	H	neoSTX	GTX6(B2)	dcneoSTX	hyneoSTX	—
OH	OSO ₃ ⁻	H	GTX1	C3	dcGTX1	—	—
H	OSO ₃ ⁻	H	GTX2	C1	dcGTX2	—	doGTX2
H	H	OSO ₃ ⁻	GTX3	C2	dcGTX3	—	doGTX3
OH	H	OSO ₃ ⁻	GTX4	C4	dcGTX4	—	—

三、PSP 毒素的作用机理

PSP 毒素属于胍类毒素, 其活性部位为 7, 8, 9 位的胍基, 与可兴奋细胞膜上的电压门控 Na⁺ 通道位点 1 的氨基酸残基高亲和(Penzotti et al., 1998), 通过选择性阻断 Na⁺ 内流, 阻碍动作电位的形成而起抑制作用。由于神经钠通道、脑钠通道、心钠通道、骨骼肌钠通道等各种钠通道存在差别, PSP 毒素 7, 8, 9 位的胍基与钠通道氨基酸残基的结合也有所不同, 但都是与更靠近钠通道外口的氨基酸残基结合。在成年兔骨骼肌钠通道, STX 通过 7, 8, 9 位的胍基与通道上的 Asp400 和 Glu755 高亲和。此外, PSP 毒素的 C-12 位的羟基(作为水合酮)和氨基酰基侧链官能团对通道阻断也起一定作用, 但不是关键性作用。在成年兔的骨骼肌钠通道, STX 1, 2, 3 位的胍基与通道上的 Asp1532 亲和, 也增加了其对钠通道的阻断作用; 而 neoSTX 在 N1 位比 STX 多了一个羟基, 此羟基能够与

Asp400 和 Tyr401 作用, 与 Tyr401 可能形成氢键, 因此比 STX 有更高的亲和力 (Penzotti et al., 2001)。通过研究龙虾巨轴突、枪乌贼巨轴突和青蛙郎飞氏结, 发现 PSP 毒素能够抑制去极化刺激产生的膜瞬时钠传导。PSP 毒素各衍生物对膜的作用机理相似, 均以剂量—依赖型方式阻断钠离子内流, 而对静息膜电位或钾通道无作用。

四、PSP 毒素的应用研究

目前, 全世界对藻毒素的需求量在不断扩增。PSP 毒素在赤潮研究、分子生物学与神经生物学基础研究、医学、军事等方面均有应用潜力。1995 年以前尚无 PSP 毒素的商品出售, 近几年才逐渐有 STX、neoSTX 及 GTX 上市, 但价格昂贵。

1. PSP 毒素在赤潮研究、监测方面的应用

由于有害赤潮发生的频率不断增加, 它已对世界许多沿海国家的海产养殖业和人类健康构成威胁, 所以得到了世界各国的普遍重视, 对赤潮毒素的监测、治理等工作正在从不同角度展开。目前, 已建立了多种 PSP 毒素的监测分析方法, 包括生物监测方法和化学分析方法(表 2)。这些方法均亟须不同种类的 PSP 毒素标准。另外, 由于我国已将 PSP 毒素列为贝类产品卫生质量的监测指标, 因此也必须有足够的标准毒素供给监测部门使用。

表 2 PSP 毒素的监测方法

监 测 方 法			优 点	缺 点
生 物 监 测	小鼠法		监 测 程 序 已 由 AOAC 标 准 化, 并 在 世 界 范 围 内 被 广 泛 接 受	仅能指示出毒性的大小, 无法确定毒素的组成和含量; 所测得的毒性和小鼠的品系有关, 可比性较差, 必须进行标准毒素的校准才有可能相比; 毒性测定结果可重复性差; 需专门训练的操作人员; 小鼠维持费用较高
	家蝇法		方法简便, 造价低廉, 比小鼠法稍灵敏	小生物操作不便, 存在很多问题, 至今未被公认
	免疫监测技术	放射性免疫	受到纯化毒素的限制, 仅有几种商品化的试剂盒, 而且交叉反应性较低, 仅有加拿大和德国的两种商业化技术出售	
		酶联吸附免疫		
	细胞毒性监测		可以通过仪器分析, 有商业化的技术出售	细胞培养困难, 使用不便, 目前仅限于实验室应用
神经受体监测		对毒素的大量、快速监测; 较高的重现性和灵敏度	针对毒素的功能监测, 得到的结果可能是各种毒素共同作用的毒性大小, 而不能对毒素种类进行区分; 采用放射性标记和测定, 要求的仪器设备和消耗的费用都相对较高, 还仅限于实验室应用	
化 学 分 析	高效液相色谱	柱前衍生	仪器装置简单	必须严格控制氧化条件
		柱后衍生	Sullivan, Oshima 和 Thielert 方法各有优点和缺点, 目前是 PSP 毒素分析的首选技术	
	质谱		精确定性和定量	无普及意义
	薄层色谱		尚未广泛应用于贝类的毒性监测	
	毛细管电泳			

目前, 普遍应用的小鼠生物监测法存在许多缺点, 需要开发新的简便、快速、经济、准确的监测方法。由于纯化毒素供应的限制, 这些工作开展得还很不够, 目前仅有少数实验室对此进行了尝试, 尚未广泛应用到日常监测和管理中。因此, 亟须有批量的纯化的 PSP 毒素用以开展这方面的工作。

2 PSP 毒素在分子生物学与神经生物学基础研究中的应用

由于 PSP 毒素能够选择性地、高亲和地结合 Na^+ 通道蛋白, 阻断 Na^+ 内流, 因此 PSP 毒素可以用作神经生物学、分子生物学研究的重要工具。实际上, STX 毒素已被用来绘制电压门控 Na^+ 通道的图像, 测定 Na^+ 通道的数目和亲和力, 分离和纯化钠通道蛋白, 推断氨基酸序列等。由于 STX 对递质释放和递质与突触后膜相互作用过程不起作用, 因而 STX 是分析递质释放机制和递质与突触后膜相互作用的有力工具, 可以用来研究生物体的生理调节和生化过程。

3 PSP 毒素在医学方面的应用

PSP 毒素的医学研究开始于 PSP 中毒及其治疗。在得到纯化的 STX 毒素之后, 人们开始认识和理解 PSP 毒素的作用机制及生理效应。根据这方面的研究, 人们才开始意识到 PSP 毒素可能具有药用活性。

(1) PSP 毒素中毒及解毒

尽管很早以前就有 PSP 毒素中毒事件的记载, 但直到 20 世纪 20 年代, 才把 PSP 毒素和甲藻联系起来。进入 70 年代以后, PSP 毒素中毒事件无论在数量还是在分布区域上都有明显增加, 1970 年以前有记录的人类中毒事件约有 1600 次 (Prakash et al., 1971), 而 1970~1984 年就发生了 900 次 (WHO, 1984)。发生地从美国、欧洲北部和日本扩展到亚太地区、欧洲南部、南美洲以及澳大利亚等地区。

PSP 毒素中毒的最初症状为唇、口和舌感觉异常和麻木, 这是由于口腔黏膜局部吸收了 PSP 毒素。继而这些感觉波及到靠近脸和脖子的部分, 指尖和脚趾常有针刺般痛的感觉, 并伴有轻微头痛和头晕。有时在早期阶段出现恶心和呕吐。中毒稍微严重, 出现胳膊和腿麻痹, 随意运动障碍, 经常有眩晕感。中毒严重时, 则会出现呼吸困难, 咽喉紧张; 随着肌肉麻痹不断扩展加重, 最终导致死亡。中毒致死的突出特点是患者临终前意识始终清晰。危险期为 12~14h, 度过此期者, 可望恢复。

PSP 毒素中毒的严重程度由摄入的 PSP 毒素的特异性、摄入数量和排出速率决定。PSP 毒素各衍生物毒性大小与其结合 Na^+ 通道位点 1 的牢固程度密切相关 (图 2)。STX 和 neoSTX 毒性最高, 其 LD_{50} 为 $9\mu\text{g}/\text{kg}$ (小鼠, ip), 人因偶然口服食入有毒贝而致死的剂量为 1~4 mg (Schantz et al., 1992)。虽然大多 PSP 毒素带正电荷 (两个胍基官能团呈碱性, 在人体 pH 为 7.4 情况下带净正电荷), 但它们仍易于通过胃肠道黏膜被吸收。一旦吸收了毒素, 症状的严重程度就取决于毒素从体内排出的速率。给麻醉的狗静脉注射 100 个鼠单位 (MU) 的贝毒, 2h 后有 40MU 经尿排出。给小鼠静脉注射亚致死剂量 ($3.8\mu\text{g}/\text{kg}$) 氙标记的 saxitoxinol, 4h 内从尿中排出 saxitoxinol 约 60%, 而粪便中无氙标记的 saxitoxinol (Hines et al., 1993)。给小鼠静脉注射亚致死剂量 ($2\mu\text{g}/\text{kg}$) 的 STX, 注射 4h 后, 尿中排出注射剂量 STX 的 19%; 24h 后, 排出 STX 约 58%; 144h 后, 排出 STX 约 68% (Stafford et al., 1995)。STX 的排出主要由肾小球过滤作用参与 (Andrinolo et al., 1999)。

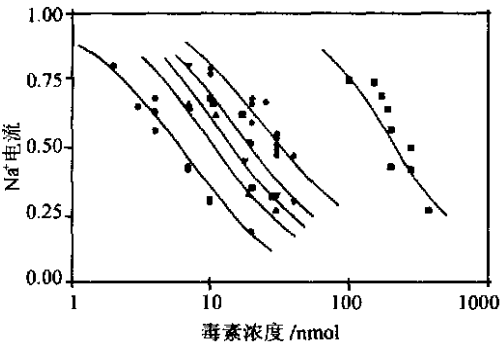


图 2 各种 PSP 毒素的浓度与 Na^+ 电流阻断程度的关系(Frace et al., 1986)
图中毒素由左至右依次为 STX、GTX3、B1、C2、GTX2、C1

中毒早期可皮下注射盐酸阿朴吗啡 5mg 引吐, 或洗胃后灌入 2%碳酸氢钠 1L, 口服活性碳吸附剂使毒素被吸附排出。对肌肉麻痹者可在急性期后给予土的宁 2 ~ 3mg 皮下或肌肉注射。一旦发现呼吸困难, 必须立即实行人工呼吸、气管插管或机械呼吸, 及时供氧。

对 PSP 毒素中毒尚无特效解毒药。有人尝试用 4-氨基嘧啶 (4-Aminopyridine, 4-AP)对 PSP 毒素中毒进行解毒 (Chang et al., 1996; Chang et al., 1997; Benton et al., 1998), 同时进行人工呼吸和注射碳酸氢钠, 可加速 STX 诱导的心搏呼吸衰弱的恢复。动物实验证实兔子 STX 抗血清能有效地与 STX 结合, 具有良好的解毒效果, 但治疗范围过窄, 为适应临床需要, 应拓宽治疗谱 (Davio, 1985)。

(2) PSP 毒素的活性研究进展

从中毒症状来看, PSP 毒素的作用靶为神经、呼吸、心血管等系统。结合 PSP 毒素的细胞、分子作用机理分析, 认为 PSP 毒素可能有局部麻醉、降压、肌肉松弛、抗肿瘤等活性。目前, 已有对 PSP 毒素作为局部麻醉剂的探索。此外, 还有许多功能尚待开发。

对神经系统的局部麻醉作用: PSP 毒素能够与电压门控 Na^+ 通道位点 1 特异性结合, 通过选择性阻断 Na^+ 内流, 阻碍动作电位的形成而起作用。STX 有很强的局麻作用, 比普鲁卡因或可卡因强 10 万倍。STX 对兔角膜、小鼠外周神经和狗硬膜能产生高频长时间的阻断作用。Kohane 等 (1999)通过测试 Na^+ 通道位点 1 阻断剂 STX 和辣椒素的关系, 证实 Na^+ 通道位点 1 阻断剂与辣椒素间的协同作用关系, 认为香草酸受体激动剂能加强经皮注射的 Na^+ 通道位点 1 阻断剂的局部麻醉作用。

对心血管的降压作用: STX 能显著降低血压 (Benton et al., 1994; Chang et al., 1993), 2 ~ 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ STX 可降低猫或狗血压的 2/3, 剂量 $\geq 1.5\mu\text{g}/\text{kg}$ 时阻滞血管神经而降低外周阻力; 剂量 $< 1.5\mu\text{g}/\text{kg}$ 时, 可以直接松弛血管平滑肌而直接达到降压目的。STX 对血管平滑肌起到松弛作用, 同时心肌动作电位的幅度和升高率亦受到压制。

对肌肉的松弛作用: PSP 毒素能导致肌肉松弛, 对呼吸等器官系统起抑制作用 (Benton et al., 1994; Chang et al., 1993)。

抗肿瘤活性作用: STX 对癌细胞的破坏性相当高, 癌细胞对 STX 比一般细胞的抵抗性小, 但是因为 STX 毒性相当大, 在相当低的剂量即可使患者中毒, 所以能否实际应用仍在研究之中 (张豁中等, 1995)。

4 PSP 毒素在军事上的应用

PSP 毒素具有潜在的军事意义。PSP 毒素中的 STX 已被收入《化学武器公约》中禁止化学品的第二类清单之中, 因此, PSP 毒素在防化研究中也具有重要的价值。

五、PSP 毒素的开发前景

通过对 PSP 毒素生物活性的研究可看出, PSP 毒素很有可能作为新型药物应用于疾病的治疗。美国 FDA (1989) 批准了第一个微生物毒素肉毒杆菌毒素作为人类疾病的治疗药 (Schantz et al., 1992), 使得剧毒毒素所拥有的高强度生物活性得到合理应用, 也为 PSP 毒素作为治疗药提供了很好的范例。

由于 PSP 毒素的稀有来源和国际社会对 STX 交易的禁止, 限制了国内 PSP 毒素应用研究的深入开展。在国家自然科学基金和国家高技术研发项目资助下, 中国科学院海洋研究所已完成了部分 PSP 毒素的分离纯化工作, 通过多柱多级分离纯化, 将毒素分级进行了制备。粗提的毒素可以用作 PSP 毒素小鼠监测的阳性对照和毒性校准, 纯化后毒素可以用作高效液相色谱分析的标准毒素, 高纯度毒素可以用作工具药和治疗药的相关研究。目前, 纯化得到的毒素可以满足赤潮藻毒素监测、研究等工作的需要; 将 PSP 毒素用于分子生物学和神经生物学基础研究, 并进一步探索其在治疗药方面的应用工作也在积极展开之中。

可以预见 PSP 毒素一旦作为毒素标准、工具药和治疗药投入使用, 批量生产可获得可观的经济及社会效益。

参 考 文 献

- 于仁诚、周名江, 1998, 麻痹性贝毒研究进展, 海洋与湖沼 29(3): 330~338。
- 张豁中等, 1995, 动物活性成分化学, 天津科技出版社, 860。
- Andrinolo, D., Michea L. F., Lagos N., et al., 1999, Toxic effects pharmacokinetics and clearance of saxitoxin, a component of paralytic shellfish poison (PSP), in cats, *Toxicon*, 37(3): 447~464.
- Baden D. G., 1983, Marine food-borne dinoflagellate toxins. In: "International Review of Cytology" (Bourne G. H., Danielli J. F. eds.), Academic Press New York, 82: 99~150.
- Benton, B. J., Rivera V. R., Hewetson, J. F., et al., 1994, Reversal of saxitoxin-induced cardiorespiratory failure by a burro-raised alpha-STX antibody and oxygen therapy, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 124(1): 39~51.
- Benton, B. J., Keller S. A., Spriggs D. L., et al., 1998, Recovery from the lethal effects of saxitoxin: a therapeutic window for 4-aminopyridine (4-AP), *Toxicon*, 36(4): 571~588.
- Chang, F. C. T., Benton, B. J., Lenz R. A., et al., 1993, Central and peripheral cardio-respiratory effects of saxitoxin (STX) in urethane-anesthetized guinea pigs, *Toxicon*, 31(5): 645~664.
- Chang, F. C. T., Bauer, R. M., Benton, B. J., et al., 1996, 4-Aminopyridine antagonizes saxitoxin and tetrodotoxin-induced cardiorespiratory depression, *Toxicon*, 34(6): 671~690.
- Chang F. C. T., Spriggs D. C., Benton, B. J., et al., 1997, 4-Aminopyridine reverses saxitoxin (STX)- and tetrodotoxin (TTX)-induced cardiorespiratory depression in chronically instrumented guinea pigs, *Fundam. Appl. Toxicol.*, 38(1): 75~88.
- Davio S. R., 1985, Neutralization of saxitoxin by anti-saxitoxin rabbit serum, *Toxicon*, 23(4): 669~675.
- Frace, A. M., Hall S., Brodwick, M. S., et al., 1986, Effects of saxitoxin analogues and ligand competition on sodium currents of squid axons, *Am. J. Physiol.*, 251(2 Pt 1): C159~166.
- Hines H. B., Naseem, S. M., Wannemacher, R. W., 1993, [^3H]-saxitoxinol metabolism and elimination in the rat, *Toxicon*, 31(7): 905~908.
- Kohane D. S., Kuang Y., Lu N. T., et al., 1999, Vanilloid receptor agonists potentiate the in vivo local anesthetic

- activity of percutaneously injected site 1 sodium channel blockers. *Anesthesiology*, 90(2): 524~534.
- Lagos, N., Onodera, H., Zagatto, P. A., et al., 1999, The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. *Toxicon*, 37(10): 1359~1373.
- Onodera H., Satake, M., Oshima Y., et al., 1997, New saxitoxin analogues from the freshwater filamentous cyanobacterium *Lyngbya wollei*, *Nat. Toxins*, 5(4): 146~151.
- Penzotti J. L., Fozzard, H. A., Lipkind, G., et al., 1998, Differences in saxitoxin and tetrodotoxin binding revealed by mutagenesis of the Na⁺ channel outer vestibule. *Biophys. J.*, 75(6): 2647~2657.
- Penzotti J. L., Lipkind, G., Fozzard H. A., et al., 2001, Specific neosaxitoxin interactions with the Na⁺ channel outer vestibule determined by mutant cycle analysis. *Biophys. J.*, 80(2): 698~706.
- Prakash, A., Medcof, J. C., Tennant, A. D., 1971, Paralytic shellfish poisoning in Eastern Canada. *Bull. Fish. Res. Board Can.*, 117: 1~88.
- Schantz E. J., Johnson, E. A., 1992, Properties and use of botulinum toxin and other microbial neurotoxins in medicine. *Microbiol. Rev.*, 56(1): 80~99.
- Stafford, R. G., Hines H. B., 1995, Urinary elimination of saxitoxin after intravenous injection. *Toxicon*, 33(11): 1501~1510.
- Steidinger, K. A., 1993, Some taxonomic and biologic aspects of toxic dinoflagellates. In: "Algal Toxins in Seafood and Drinking Water" (Falconer, I. R. ed.), Academic Press. 1~28.
- WHO, 1984, Aquatic (Marine and Freshwater) Biotoxins. Environmental Health Criteria 37, International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Geneva.

ADVANCE OF RESEARCHES ON APPLICATION OF PARALYTIC SHELLFISH POISONING TOXINS^{*}

WANG Yunfeng, YU Rencheng, LI Jun, YAN Tian, FU Meng, ZHOU Mingjiang

(*Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences*)

Abstract

Paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins are toxins produced by harmful red tide algae, such as some species of marine dinoflagellate and blue-green algae. PSP toxins, including saxitoxin and its derivatives, are tetrahydropurines composed of two guanidinium functions. PSP toxins can selectively block the voltage-gated sodium channel of many excitable membranes. The 7, 8, 9-guanidinium moiety is essential for the blocking activity. PSP toxins can be used in many fields. In the study of red tide, purified PSP toxins can serve as standard toxins to analyze algal and shellfish samples. Development of new methods for toxin-monitoring also needs purified PSP toxins. In studies of neurobiology and molecular biology, saxitoxin has been widely used as research tool. PSP toxins also show activities as local anesthetics, in treating cancer and so on. However, the functions still need to be confirmed and studied. In summary, PSP toxins have great potential for different applications, despite the huge damages they have made in the past several decades.

^{*} Contribution No. 4366 from the Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences.