赤潮生物的毒害机理与毒素生物化学研究*

TOXIC MECHANISM OF MARINE PHYTOPLANKTONS AND THE BIOCHEMICAL ASPECTS OF THEIR TOXINS

周成旭　　严小军

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

对赤潮毒素的研究已成为当前国际上的一个研究热点。本文仅对赤潮生物的毒害机理与毒素生物化学的研究进展进行综述。

1　亚历山大藻(*Alexandrium* spp.)的毒害机理

亚历山大藻的毒害机理是在代谢过程中产生麻痹性贝毒。1975年,当第一个麻痹性贝毒石房蛤毒素(STX)的化学结构用X射线结晶学方法鉴定成功时,发现这个分子属于生物碱类型,其基本骨架单元是全氢化嘌呤。通过同位素分子对 *Alexandrium tamarense* 和 *Aphanizomeno flos-aquae* 的培养试验发现,该毒素是由精氨酸和乙酸通过一种特殊的合成途径形成的。

从同位素示踪实验发现,在石房蛤毒素合成过程中,乙酸分子通过一个不常见的氨基酸 Claisen 缩合方式加成到精氨酸的 α 碳上,但是这种加成方式与卟啉生物合成过程中,琥珀酸加成到甘氨酸上形成 δ-氨基乙酰丙酸[Aminolevulinic acid(ALA)]的过程颇为相似。而精氨酸分子则全体参与了石房蛤毒素的生物合成,尔后,其氨基上又由另外一个精氨酸分子转移上一个亚胺基团形成胍基。石房蛤毒素侧链上的碳是由蛋氨酸上的甲基所提供,然后通过环氧化及精氨酸的胱氨酸加成形成完整的石房蛤毒素。因此,3个精氨酸、一个乙酸和一个蛋氨酸组成了一个石房蛤毒素分子。石房蛤毒素分子还可以进一步衍生化,如磺酸化等形成其他麻痹性贝毒素。最近的研究结果表明,在两种有毒藻 *Alexandrium tamarense* 和 *A. catenatum* 中存在催化毒素转化的酶。这种修饰性酶有非常重要的应用价值,例如,*A. tamarense* 的细胞提取物可以将石房蛤毒素的1-NH转化成1-NOH,形成两个新的衍生物,表现出细胞内的氧化酶活性特征。从 *Gymnodinium catenatum* 中发现硫酸转移酶活性,在外源性的腺苷-3′5′-二磷酸的存在下,将石房蛤毒素中的21-NH_2 转化成21-NSO_3^-。

对于一个特定的浮游生物种来说,PSP并不是该特定生物种的必需或必然的代谢产物,因此,产生毒素并不是该种甲藻所普遍存在的,其生物合成是不可预测的,产生毒素的种株具有局限性,在对产毒藻进行研究的过程中发现,在同一地区、同一种藻中有毒和无毒的品系可以同时共存;实验室培养的有毒藻会突然失去产毒的特征[1]。例如,在产生PSP的甲藻 *Alexandrium* spp. 具有许多不产毒的种株;而产生PSP的蓝藻 *A. flos-aquae* 仅有两株,绝大部分是无毒株。另外,产生PSP的生物种类多样化。除甲藻之外,红藻 *Jania* sp. 和蓝绿藻 *Ahanizomenon flos-aquae* 也可以产生麻痹性贝毒毒素。产毒生物的多样性促使人们考虑毒素的真正来源。同时,在自然海域中,尽管没有明显的赤潮,但贝类仍然表现出毒素的累积,这些现象都说明毒素可能并非只来自有毒藻本身。对其他毒素,如河豚毒素的研究表明,毒素产生往往同细菌存在一定的联系。因而在对有毒藻毒素产生机制的研究中,藻菌关系研究成为一个热点。早在1962年,Silva 就提出了甲藻内共生细菌产毒的假说,并对内共生细菌进行了研究,但一直没有确切的细菌产毒证据。直到1988年,Kodama 才首次从一株高毒的 *Alexandrium tamarense* 中分离到一株胞内产毒细菌。它可以在独立培养的条件下产生麻痹性贝毒毒素,但产量相对较低。对这株细菌的生理生化研究表明,这株细菌是

* 国家自然科学基金资助项目39600028号,中国科学院海洋研究所调查研究报告第3851号。
收稿日期:1999-06-04;修回日期:1999-12-01

Moraxella 属,其产毒量在磷元素缺乏条件下升高,这同培养的产毒藻在磷缺乏条件下产毒量增加类似。在此之后,该实验组又从其他地区的产毒藻中分离出了产毒细菌。Doucette 等[2]应用生物化学和分子生物学技术分离出 *Alteromonas pseudomonas* 类的细胞外细菌,它们产生的毒素组成相对稳定,毒素含量在磷缺乏条件下上升,并且与作为能源的有机物有关。这些证据表明,与产毒甲藻共存的细菌中有的可以产生麻痹性贝毒。但到目前为止,还只有 Kodama 实验组成功分离了产毒细菌。那么甲藻本身是否可以产生毒素呢?研究表明,在培养条件一致时,甲藻的毒素组成是相对稳定的,也就是说不同种甲藻,甚至在不同的地理区系中分离出的不同品系,它们的毒素组成可能存在差别,而这种差别可以保持稳定。

麻痹性贝毒究竟是由甲藻本身产生还是由甲藻的共生细菌产生的,有毒甲藻的交配试验可以说明许多问题。如果毒素遗传具有孟德尔规律,说明毒素基因位于染色体;如果毒素基因具有单亲型,说明毒素基因位于线粒体或叶绿体;如果毒素遗传出现随机性特点,说明毒素基因位于质粒或其他自动复制单元,如细胞内细菌。到目前为止,仅有非常少的甲藻交配实验报道,原因之一是有毒种株的交配十分困难。对具有不同麻痹性毒素组成的甲藻株进行交叉有性生殖实验,实验的藻种包括 *Alexandrium tamarense*, *A. catenella*, *A. fundyense*,实验结果表明,毒素组成的遗传符合1∶1孟德尔分离,这表明毒素组成是伴随染色体稳定遗传的。因此毒素组成与有毒藻本身遗传物质密切相关,由此推断至少毒素组成是由有毒藻本身的酶决定的。另外,毒素的遗传与性别无关,可以说明,产毒基因定位不在性染色体上。

对于产生 STX 的蓝藻 *Aphanizomenon flos-aquae* 来说,这些藻株通常含有细菌,细菌的数量与毒素的数量呈正相关性。从已有的结果来看,麻痹性贝毒的遗传基因是成块的。但究竟是由甲藻本身产生还是由甲藻的共生细菌产生尚不清楚。但是似乎可以得出这样的结论:细菌可以产生麻痹性贝毒;但甲藻本身的染色体基因也可以产生麻痹性贝毒,并可以稳定遗传。

2 短裸甲藻(*Gymnodinium breve*)的毒害机理

短裸甲藻的毒害机理是在代谢过程中合成短裸甲藻毒素(Brevetoxin)和大田软海绵酸(Okadaic acid)。短裸甲藻毒素的生物合成的起始结构是全反式的多烯链,而途径的关键步骤是该链的多次环氧化和级联式开环反应。对短裸甲藻毒素的生物合成研究表明,这种同时开环反应起始于分子的右末端,因此,所形成的短裸甲藻毒素的右末端具有一个β羟基。

大田软海绵酸的基本骨架几乎全部是由乙酸分子构成的,其起始分子则是乙醇酸。但是,到目前为止,分子中某些部分还不能用乙酸分子进行合理的解释。另外一个重要的结构特征是:大田软海绵酸中的甲基侧链是由乙酸通过亲核加成后脱羧形成的。这种甲基化方法与某些细菌的代谢产物的生物合成途径相似。

3 拟尖刺菱形藻(*Pseudo-nitzschia multiseries*)的毒害机理

拟尖刺菱形藻是通过代谢所产生的一种特殊的氨基酸——软骨藻酸致毒的[3]。软骨藻酸可以干扰哺乳动物及人的神经信号传递。软骨藻酸可以与谷氨酸神经递质的受体相结合,它的结合效率比谷氨酸高得多。这种结合过程使神经细胞产生错误指令,误认为谷氨酸浓度过剩,而将其排除出去,直到所有的谷氨酸都被消耗完,以致使神经细胞死亡。它的一种结构类似物,海人草酸也是从红藻如 *Digenea simplex*, *Palmeria plamata*, *Centrocetos clvulatum* 中发现的,但是,它对神经受体的结合力没有软骨藻酸高。由此开发成功了非常灵敏的软骨藻酸测定方法。先将海人草酸进行放射性标记,并使其与神经受体结合。当出现软骨藻酸时,海人草酸就从受体上释放下来,通过测定游离的放射性强度,就可以测定软骨藻酸的浓度。

软骨藻酸的基本骨架是谷氨酸,其侧链是单萜,即异戊二烯的二聚体。其基本的生物合成途径是谷氨酸与3,4-二甲基辛二烯-2,6-焦磷酸(Geranyl pyrophosphate)发生环化反应。

4 赤潮异湾藻(*Heterosigma akashiwo*)与褐胞藻(*Chattonella*)的毒害机理

根据目前的研究,赤潮异湾藻和褐胞藻赤潮对人体无害但它却对渔业造成很大的危害,特别是对网箱养殖的鲑鱼,对赤潮异湾藻和褐胞藻引起的死鱼进行的组织病理学研究表明,鱼的主要病理变化是腮瓣粘膜层消失,渗透调节功能受到损伤,腮瓣水肿,导致缺氧死亡。对于赤潮异湾藻和褐胞藻的毒害原因众说不一,例如,不饱和脂肪酸、鱼毒素等。但目前更为广泛接受的理论是自由基学说,即赤潮异湾藻和褐胞藻

产生的超氧自由基和羟基自由基可以对鱼造成危害。

赤潮异湾藻和褐胞藻含有许多叶绿体，光合作用过程中可以产生自由基，赤潮异湾藻和褐胞藻对细胞色素 c 具有还原能力，当将赤潮异湾藻细胞加入含细胞色素 c 的溶液中时，反应快速进行，在 10 min 时达到平台期，经过计算，每 10^4 个细胞可以产生超氧自由基（$O_2^- \cdot$）的速率是 0.165 nmol/ min，产生过氧化氢的速率为 0.062 nmol/ min，当加入超氧化物歧化酶（SOD）后，对超氧自由基抑制效率为 50%，即使加入更多的 SOD，细胞色素 c 的还原反应也不能被完全抑制，说明赤潮异湾藻具有与超氧自由基无关的还原作用。当加入过氧化氢酶后，产生过氧化氢的反应几乎被完全抑制[4]。

褐胞藻具有强烈的杀菌能力，以褐藻胶降解弧菌（*Vibrio alginolyticus*）为例，褐胞藻可以强烈抑制弧菌的生长。例如，当单独培养 7 h，细菌数量可以增加 30～40 倍，而如果与褐胞藻同时培养时，细菌数量只有起始接种数量的一半以下。当加入过氧化氢酶和超氧化物酶后，细菌的数量完全恢复到空白状态相同的水平；当单独加入过氧化氢酶时，细菌数量为起始数量的 17 倍，而加入超氧化物酶后，细菌数量仅为 1.7 倍。另外加入少量的苯甲酸钠，也可以使细菌数量增加至 24 倍。以上实验说明，褐胞藻对褐藻胶降解菌产生抑制作用的主要是羟基自由基，而不是超氧自由基。因为苯甲酸钠是典型的羟基自由基清除剂，而对超氧自由基没有作用。超氧自由基只是产生羟基自由基的中间形态，其本身没有很强的毒性。羟基自由基是非常活泼的自由基，已经证明，它可以使蛋白质降解、DNA 长链断裂，导致细胞死亡。

赤潮异湾藻和褐胞藻在正常培养条件下就能产生超氧自由基和羟基自由基，采用电子自旋共振仪清楚地观察到自由基的峰，赤潮异湾藻和褐胞藻对鱼毒害的室内实验也证明了同样的死亡原因，在一般的培养液条件下，赤潮异湾藻和褐胞藻对鱼的死亡率 24 h 后可达 100%，如果在培养液中加入超氧化物歧化酶，可以将鱼的死亡率下降为 20%，出现死亡的时间延长至 100 h 后，单独加入过氧化氢酶不仅可以使鱼的死亡率也下降至 20%，而且出现死亡的时间延长至 230 h。证明，羟基自由基清除成分可以更有效地防止鱼由赤潮异湾藻和褐胞藻引起的死亡。

但是，究竟是什么原因使赤潮异湾藻和褐胞藻产生自由基的呢？一个原因是赤潮异湾藻和褐胞藻含有丰富的铁元素，铁元素在自由基的产生过程中起了很强的促进作用。另外，赤潮异湾藻中含有的特殊化合物也可能是产生自由基的原因，这种有机化合物可以与重氮盐发生反应，因此，极有可能是有机胺。另外，最近提出了赤潮异湾藻免疫学说。该学说基于这样的事实，即对世界范围内的赤潮异湾藻的核糖体基因序列测定结果表明，赤潮异湾藻的基因序列具有很强的保守性，说明种的遗传变异很小，但是，世界各地的赤潮异湾藻却具有不同的毒性，有些地区的赤潮异湾藻尚未有渔业危害的报告。对实验室的品种也观察到同样的现象，有些品种毒性很强，而有些则不。由此说明，赤潮异湾藻的毒害是与环境密切相关的，例如赤潮异湾藻与细菌的相互作用等。免疫学说认为，赤潮异湾藻在保护自身免受水体中或细胞内细菌或其他病原体攻击时，产生免疫反应，即产生自由基杀死细菌。这个学说不仅与现有的自由基理论相符合，而且涉及了自由基学说没有涵盖的生理生化过程，指出赤潮异湾藻的毒害是与其环境及生存群落中的其他微生物相互作用的结果。

5 赤潮生物毒害机理的分子生物学研究

大量的生理生态学和遗传学研究结果认为，毒素基因具有成块性，一旦某个特定毒素合成的基因被定位，可以采用某些分子生物学手段，如 Primer Walking PCR 法分离出完整的毒素合成基因组。因此，毒素基因的定位研究也十分诱人。但是，到目前为止，该领域的研究尚未取得成功。

从理论上说，有几种方法均可以用来直接鉴定毒素的生物合成基因。但到目前为止，没有一种方法获得成功[5]。

直接鉴定基因的经典遗传学方法是：首先通过化学或紫外线等方法使大量的细胞遗传基因突变，然后，将它们放到固体培养基上培养，然后，挑选单个细胞形成的菌落，筛选所希望获得的表型，即无毒株（tox^-）。但是这个方法没有办法在毒素研究中获得使用，原因是甲藻的培养非常困难。一些分子生物学技术尚不完善，如流式细胞仪目前无法区分有毒株或无毒株。而生化标记的方法也无法使用，因为毒素是胞内产物，无法在活体情况下直接应用。另外一个问题是，甲藻细胞具有非常庞大的基因组，理论上来说，随机突变的数量必需达到 10^4～10^7，才能产生无毒株。而对于无毒株的筛选必须经过 HPLC 分析才能

确定,这样的工作量在实际上是无法实现的。即使这种突变方法成功地建立了无毒突变株,对突变株的遗传分析也十分困难。由于毒素基因并非是微生物的致死基因,无法以此作为筛选手段。

另外一种直接鉴定基因的方法是:根据目标肽链制备抗体,然后筛选表达文库,从而鉴定毒素基因。这个方法遇到的第一个困难就是:毒素分子并非肽类,而其生物合成过程中的酶的分离也异常困难。另外一个困难是,海洋生物毒素具有特异性,至今尚未在其他生物中有已知的异源基因。如果毒素合成的基因在其他生物中是已知的,鉴定海藻中的基因就相对容易。可以采用异源 DNA 杂交,保守域引物的 PCR 扩增来研究其基因定位。

第三种直接鉴定基因的方法是:将产毒株甲藻的基因组全部克隆到大肠杆菌中。这样的 DNA 文库可以通过对随机酶切的 DNA 片断用噬菌体载体装配来产生。这个方法也不现实,因为遗传子使用的特异性及基因系列表达促进子的不同,一个生物的基因在另外一个生物中表达通常是较低的。在另一种极端情况下,由于外源基因的高拷贝,外源基因会得到过量表达,甚至造成主体的死亡。即使这些外源基因在大肠杆菌中得到了适度的表达,还有一个问题是无法克服的,因为毒素合成过程中涉及多个酶系统,而大肠杆菌却只能克隆数千个碱基对,因此,很难将毒素合成的全部基因克隆到一个大肠杆菌中。这样,大肠杆菌就无法产生可以确认的毒素化合物。在这点上,可能软骨藻酸是一个另外。如果采用 cosmid 载体(它与噬菌体 λ 载体合用可以克隆 35 000 ~ 45 000 碱基对),或酵母人工染色体(YAC)可以直接克隆 200 000 ~ 500 000 碱基对。DNA 库建立在理论上可以用这些载体完成,但筛选毒素合成的工作量仍将十分巨大,毒素合成基因在主体中不表达的可能性也很大,因此,这个方法有很大的冒险性。

最近采用的研究方法使毒素克隆研究取得了一些新的进展。这种方法就是环境差异法。首先,建立多种不同的培养条件,根据毒素累积的变化确定环境差异条件,如光强度、营养介质组成,或者不同生长期的细胞等。然后收获具有不同毒素产生水平的细胞,最理想的是在一个条件下有毒素产生,而在另一个条件下毒素不产生。对于这两组不同的细胞,分别提取其 mRNA,然后通过反转录酶形成单链的 DNA,再将其转变成双链的 cDNA,然后用 PCR 扩增。对于扩增的 PCR 产物进行电泳分析,将只出现在产毒株中的特异 DNA 产物从凝胶上直接切下来,并放到特殊的载体中表达。虽然,最终证实这样的特异 DNA 究竟是不是毒素合成的基因还为时尚早,但这个方法为毒素基因的克隆提供了捷径。

最近采用这个办法的研究结果发现,对于 *Alexandrium fundyense* 细胞来说,处于 G1 期的细胞产毒高,而处于间歇期与有丝分裂期之间的细胞产毒为零,而且在这两种不同生长期的细胞中发现了特异性的双链 cDNA 产物。同样的方法对产毒蓝藻 *Aphanizomenon flos-aquae* 进行研究发现,当老细胞转移到新鲜培养基时,毒素产生数量下降,这个毒素生产的下降过程与细胞的快速分裂期吻合,表明细胞指数生长期的早期阶段对毒素有负调节作用。而当细胞进入静止期时,毒素很快增加。采用 mRNA 体外翻译系统发现,在毒素累积阶段出现了特异性的 mRNA。

但是,这个方法仍然存在潜在的问题,毒素合成酶可以通过多种环境因素来激活,例如翻译后调节方式。而 mRNA 可以是翻译调控,而非转录调控。在甲藻中已经证明存在很高程度的翻译调控。另外一个弱点是:由于 PCR 在扩增过程中可以将少量的,甚至是单个的 mRNA 拷贝大量扩增,因此,如果在非产毒的甲藻中也存在微量的产毒株,将会使真正的毒素合成基因漏检。最近发展的一项新技术,称为代表性差异分析(RDA)可以克服上述方法的缺陷。RDA 在上述方法基础上加入一个杂交步骤,可以区分出低水平的 mRNA。因此,可以预计,随着分子生物学技术的不断发展,甲藻毒素的基因及其调控方式将在不远的将来被阐明。

参考文献

1 Taroncher-Oldenburg, G., Kulis, D. M. *et al.*. *Limnol. Oceanogr.*, 1997, 42: 1 178 ~ 1 188

2 Doucette. *Nat. Toxins*, 1995, 3: 65 ~ 74

3 Bates, S. S., Douglas, D. J. *et al.*. *Nat. Toxins*, 1995, 3: 428 ~ 435

4 Yang, C. Z., Albright, L. J. *et al.*. *Dis. Aqu. Org.*, 1995, 23: 101 ~ 108

5 Plumley, F. G.. *Limnol. Oceanogr.*, 1997, 42: 1 252 ~ 1 264

(本文编辑:张培新)