

河豚毒素研究进展*

A REVIEW ON TETRODOTXIN

邓尚贵¹ 彭志英² 杨萍¹ 吴铁³ 陈芳³¹ 湛江海洋大学水产学院 524025)² 华南理工大学食品生物工程学院 广州 510640)³ 广东医学院 湛江 524025)

近年来,海洋生物活性物质(包括生物功能材料、生物毒素和海洋药物等)的研究和开发利用已成为海洋生物资源高值化的热门研究课题。迄今发现的3 000多种包括萜类、肽类、聚醚类、生物碱、皂苷类等在内的海洋生物活性物质因其具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗炎症、强心等一种或多种生物活性,已经在功能食品、食品添加剂、药物、化工等领域发挥了重要的作用。海洋生物活性物质今后的研究方向和重点一方面应该继续探索未知的活性物质,另一方面应该对已知活性物质进行功能性拓展研究和开发。本文对河豚毒素(Tetrodotoxin, TTX)分布、结构和功能等进行阐述,以期更好地理解它的作用与功能,为进一步探索和拓展其生理功能提供基础理论。

1 河豚毒素的分布、结构和性质

TTX广泛存在于河豚等多种海洋脊椎动物、无脊椎动物及海底沉积物中,目前提取TTX的主要原料为红鳍东方豚、豹纹东方豚、紫色东方豚、月腹东方豚及潮骚东方豚。TTX及其衍生物——河豚酸、4-表河豚毒素及脱水-河豚毒素在河豚中含量较为丰富,在血液、鳃、皮肤及生殖腺、肝脏、肾脏和脾脏中都存在着不同程度的毒性,但其主要分布于河豚的肝脏和卵巢中^[33],而人工养殖的河豚完全无毒或含毒极低。TTX的化学结构是具有多羟基氢化5,6-苯吡啶母核结构,分子式为C₃₁H₄₇N₇O₈,分子量为319,结构式见文献[6]。它微溶于水、乙醇和浓酸,在含有醋酸的水溶液中极易溶解,不溶于有机溶剂,纯品为无臭无色针状结晶,易被碱还原,其衍生物为白色无定形酸性物质。TTX非常稳定,在日光下暴晒20 d或在盐水中盐腌30 d,其毒性仍不能被全部破坏。它只有在高温加热30 min以上或在碱性条件下才能被分解。

2 TTX的提取和检测方法

2.1 TTX提取方法

TTX的提取方法主要有乙酸提取或改良乙酸提取^[11]、树脂提取^[10]和甲醇提取^[18]等,可以说TTX的常规提取方法已经基本成型。当然也可以引入膜分离、亲和分离、超临界萃取等现代高效率分离提取技术,但目前未见有这方面的文献报道。

2.2 TTX检测方法

1964年Tsuda等人首次从河豚鱼内脏中分离得到了TTX并测定了化学结构,1972年完成了全人工合成。已建立的TTX检测方法有生物检测法^[24,32]、化学检测法^[34]、免疫学检测法^[3,17]、移位检测法^[18]、组织培养法^[34]等。

2.2.1 生物检测法 最早的生物检测法是20世纪40年代Kao基于一定重量的小鼠经腹腔注射TTX后其死亡时间的倒数与TTX剂量之间存在线性关系而建立起来的。这种方法因操作简便仍是日本法定的检测方法,但重复性差、费时费力且要受到共存的氨基酸和无机离子的影响导致结果显著偏低,使它的缺陷非常突出;1984年Davio等依据TTX可特异置换事先与大鼠脑膜受体结合的HSTX(石房蛤毒素)建立了竞争性置换检测法,操作虽简单,但需要液闪仪,同时无法测定含盐量高的样品。

第一作者:邓尚贵,出生于1966年,博士,副教授,主要研究领域为水产品深加工、海洋药物和海鲜调味料。

E-mail: dengshanggui@163.com

收稿日期:2002-02-27;修回日期:2002-05-24

2.2.2 组织培养法 较早的组织培养法是1988年Kogure等根据TTX对Na⁺通道的阻断作用与细胞的成活率之间的关系而建立起来的,该法的最低检出限为 9.6×10^{-4} mg/L;1991年Kaofman等人对其改良并建立了定量比色细胞分析法。

2.2.3 化学检测法 20世纪70年代以后随着仪器分析发展,TTX的分析检测也得到了迅速的发展。1976年Nunez等依据其在碱性条件下可被水解为荧光物质2-氨基-6-羟甲基-8-羟基-喹啉(即C₉碱)建立了最早的荧光分析法,该法的检出限为0.34~10.0 mg/L;1982年Yasumoto等对荧光检测法进行了改进,建立了TTX的连续自动分析技术,其检出限为0.44~88.0 mg/L。TTX在碱性条件下生成C₉碱的同时还定量生成草酸钠,据此建立了紫外分光光度法,其检出限为20~100 mg/L。1988年Ikebuchi等建立了不需水解的薄层分析方法,从而避免了水解过程产生的衍生物的影响,其检出限为 4.0×10^{-2} mg/L;1991年林乐明等还建立了板上碱反应/薄层色谱荧光法,检出限为40 mg/L,但其原理与前者相同。1982年Nakayama等开始使用高效液相色谱法定量分析TTX,整个检测过程只需15 min,检出限为 2×10^{-3} ~ 3×10^{-3} mg/L;随后1984年Bontemps等发现按Nakayama等的方法在230 nm处并无明显吸收,并对其进行了改进。由于这种方法集分离与定量于一体,检测也快速灵敏,所以后来许多研究者如Yasumoto等和Yotsu等都在这方面进行了研究,但所需仪器昂贵,样品纯度要求高,因而难以推广应用。Suenaga等和Fumio等建立的GC/MS联机检测法使TTX的检出限达到 1.0×10^{-2} mg/L,其基本原理是TTX水解为C₉碱再用N₂O二乙酰胺+三甲基氯硅烷+吡啶(2:1:1)TMS化后进行测定。其它还有许多物理化学检测方法,如1983年Kazuoko等建立了检出限为10.0 mg/L的毛细管电泳检测法;1988年Nagashima等建立了TTX的薄层色谱/快原子轰击质谱法,其检出限为0.1 mg/L;1989年Quilliam等成功地用离子溅射质谱应用于TTX的定性和定量分析中,其检出限为0.2 mg/L。

2.2.4 免疫检测法 20世纪80年代末,又出现了免疫学检测法研究热潮。TTX的免疫检测法的基础是单克隆抗体(McAb),是将小分子的TTX连接到大分子载体(如BSA, KLH等)上,使其成为完全抗原并应用于动物。最早的免疫检测法是1989年Watabe等以BSA为载体的方法,但存在着McAb反应性低的显著缺陷。1992年Raybould等,1989年Huot等,1992年Matsumura等、Chu等^[17]及王健伟等^[3]经过不懈的研究,使这种检测方法日趋完善。

上述这些方法各有优缺点,可根据实际需要和条件选择使用,但以组织培养法最为简便实用,特别适用于天然物质及食品中TTX的定性和定量分析^[4]。

3 TTX的毒性与功能

3.1 TTX的毒性及作用机制

TTX属海洋胍胺类毒素。近年来的研究成果表明,TTX是由细菌产生,经食物链作用传递到动物体内。TTX是通过与钠离子通道受体结合,阻断电压依赖性钠通道,从而阻滞动作电位,导致与之相关的生理活动的阻碍,主要是神经肌肉的麻痹。构效关系研究表明,TTX的活性基团是1,2,3位的胍胺基和附近的C₄,C₉,Cl₀位的羟基。胍胺基在生理pH条件下发生质子化,形成正电活性区域与钠通道受体蛋白的负电性羰基相互作用,阻滞钠离子进入通道^[7,12,23]。钠通道受体至少有6个特异性靶分子结合位点,TTX是与钠通道受体部位I结合。只有当毒素应用于膜外侧,才能阻止钠离子进入细胞内。进一步研究显示,毒素受体位于可兴奋细胞膜外侧、钠通道外口附近^[19]。毒素与受体部位结合后,阻止钠离子接近通道的外口,使钠离子不能通过通道进入细胞内。TTX特异性作用于钠通道,对钾通道、钙通道等其它离子通道无直接影响,对神经肌肉接头的突触及胆碱酯酶也无直接作用,因此被作为确定钠通道位置的首选化学标记物,是研究钠通道的重要工具药。单通道记录结果表明TTX阻塞钠离子通道是一种“全或无”的方式,毒素和通道也是1:1的关系,即一个毒素分子堵塞一个通道。毒素分子与受体结合是可逆的,Na⁺,K⁺,Mg²⁺,Ca²⁺等可与其竞争受体^[20]。TTX对钠通道的阻滞具有选择性,只阻滞电压依赖性通道,而且对神经细胞的钠通道敏感性比心肌、骨骼肌上的钠通道要高得多^[27]。TTX只阻滞动作电位的传导,而对静息电位、静息膜电位和延迟整流等作用不明显^[31]。

TTX对小鼠腹腔注射的半数致死量是 8×10^{-9} ~ 1.0×10^{-9} ,比氰化钠毒性大1000倍以上。中毒后主要是神经肌肉的麻痹,导致呼吸循环抑制,随意肌无力。对呼吸的抑制表现为呼吸变慢,呼吸肌收缩无力,对心血管系统的抑制表现为血压下降,心率减慢,心律失常。有实验研究指出,毒素能进入中枢起作用,如TTX注入猫脑脊,能迅速引起呼吸变慢,血压下降^[15]。对中枢作用的进一步研究发现:给豚鼠腹腔注射TTX,同时观察脑干吸气相关神经元和呼气相关神经元活动,表明TTX对这两个部位神经元放电均有抑制作用,它使中枢呼吸节律减缓,并发现TTX对髓部的节律发生有直接和持久的抑制作用,同时

观察到膈肌放电减慢^[16]。这些研究表明毒素能透过血脑屏障进入中枢并对中枢产生明显的抑制作用。因此,一般认为 TTX 对呼吸和心血管系统的抑制是对中枢和外周共同作用的结果。

3.2 TTX 的应用进展

20 世纪 70 年代,发现对乌头碱、氯化钡和结扎狗冠状动脉引起的心律失常具有对抗作用,但同时发现由于毒性太大难以单独应用。这一问题在以后的 10 年中得到了较好的解决,其典型的解决办法是朱成华等 1984 年将 TTX 与戊脉安、心得安等抗心律失常药合用,在不影响 TTX 毒性的前提下既显著降低了后者的用量 (ED_{50}),又提高了治疗效果,同时也为 TTX 的临床应用提供了实验依据。1985 年颜松民等发现 TTX 对小鼠的 LD_{50} 为 $10.56 \times 10^6 \sim 10.91 \times 10^6$ 并测知其药物动力学为一级动力学过程。

90 年代中期后,对 TTX 及其应用的的研究十分活跃。1996 年王健伟等制备了 TTX 单克隆抗体并对其特性进行了初步的研究^[9],为治疗 TTX 的意外中毒提供了最为有效的手段;1999 年发现腹部注射 TTX 能显著地降低小鼠前额皮层等的多巴胺释放水平,有效地控制精神病的复发^[21];同年 Michael 和 Eva 研究了 Na^+ 通道阻滞剂——TTX 与 Ca^{2+} 电信号关系,发现活化的 Na^+ 通道是增强 Ca^{2+} 信号释放胰岛素的有效方法^[29];2000 年于丽华等的研究未发现 TTX 对小鼠的重要组织细胞存在致突变性^[11];刘涛等的研究还证明 TTX 能显著阻断 P 物质引起的 I_{sc} (上皮离子电流)变化,抑制变应性鼻炎的病理变化^[5]。

目前国内外的研究热点仍是将 TTX 作为工具药进行广泛的应用研究。如 Andriy 等^[13]首次发现小鼠输精管的平滑肌细胞存在不受磷酸化过程影响的 TTX 敏感型 Na^+ 电流的事实;Kushmerica 等^[25]应用 TTX 发现一种蜘蛛 (*Lasiodon spider*) 毒液也是拮抗离子通道的活性毒素;Liu 等^[26]在研究 TTX 的作用效应时以低于阻断 TTX 抵抗型 Na^+ 离子通道所要求的剂量低得多的剂量(平均 22.1nmol/L)灌注到脊椎发现 TTX 敏感型 Na^+ 离子通道可能是产生异常放电所必须的;Susan 等^[30]以浣熊为实验动物研究了 TTX 作为麻醉药的电生理机制,结果发现它能扩散到距探针 4.8 mm 的范围而利多卡因仅为 2.1 mm,在神经活动中的有效扩散分别为 2 和 1 mm,证明 TTX 的麻醉效果优于利多卡因;Bernard 等^[14]研究发现在 TTX 存在时荷包牡丹碱-敏感性后轴突电位频率不发生变化且 TTX 能阻止后轴突电位频率的增加,提示 TTX 能

抑制去甲肾上腺素的过度分泌引起的不良反应;Jeffrey 等^[22]研究了 TTX 对长期滥用毒品和偶尔吸食毒品的小鼠神经行为的影响,发现其作用机制有较显著的区别;Ludovic 等^[28]在研究青蛙黑素细胞钙离子波动时分别利用收缩剂藜芦定和 TTX 刺激荷尔蒙的产生,证明每一种 Ca 平衡是受不同的机制控制的。

长期的研究和临床实践证明了 TTX 对头痛、关节炎、破伤风、霍乱、伤寒、哮喘、晚期癌症等多种疾病都有疗效,同时还是一种特效的戒毒药物。上述疗效的实质是利用河豚毒素的神经麻醉起到镇痛、镇静、解痉挛等麻醉作用^[21]。

4 TTX 研究动向

尽管 1983 年伍汉霖等在《中国有毒鱼类和药用鱼类》中指出,TTX 对治疗鼻炎癌、食道癌、胃癌、结肠癌等有一定疗效,但它主要应用于晚期癌症病人以解除痛苦,其基本点集中于麻醉止痛。综观国内外对河豚毒素的研究现状,尚未发现对 TTX 与肿瘤的关系甚至用于治疗肿瘤进行研究,即使是上文提到的对一些癌症有一定的疗效,也只局限于癌症晚期的镇痛或麻醉作用。目前课题组从砒霜治疗肿瘤的成功经验得到启迪,应用唯物辩证法的原理和物质浓度效应的原理大胆设想 TTX 在治疗肿瘤中的作用,已经成功发现 TTX 具有抗肿瘤作用,并发现其抗肿瘤活性显著高于珍珠贝粘多糖。这一发现必将拓展 TTX 的利用途径,丰富抗癌及抗促癌基本理论,推动河豚鱼的养殖和综合加工与利用。

参考文献

- 1 于丽华,周力,谢克勤. 河豚毒素诱发小鼠骨髓细胞染色体畸变,小鼠骨髓细胞微核及小鼠精子畸变的研究,山东医科大学学报,2000,38(1):48~49,56
- 2 于丽华,周和. 河豚毒素对小鼠镇痛作用的实验研究,山东医科大学学报,1999,37(2):120~121
- 3 王健伟,罗雪云,计融. 间接竞争抑制性酶联免疫吸附试验测定豚鱼类中河豚毒素的研究,卫生研究,1997,26(2):106~109
- 4 李秋芬,徐怀想. 河豚毒素(TTX)及其微生物起源,海洋通报,1994,13(4):86~91
- 5 刘涛,杨平常,王斌全等. P 物质对变应性鼻炎动物模型鼻黏膜上皮短路电流的影响,中华耳鼻咽喉科杂志,1998,33(1):32~34
- 6 陈文伟. 河豚鱼的毒性及其加工利用探讨,中国海洋药物,1988,4:30~33
- 7 杜爱民,宋杰军. 河豚毒素单克隆抗体对河豚毒素阻

- 滞钠通道作用的影响, 第二军医大学学报, 1995, 16 (6): 531 ~ 534
- 8 林文釜、黄惠莉、陈少欣。河豚毒素的提取研究, 华侨大学学报(自然科学版), 1999, 20(4): 412 ~ 414
- 9 胡谦。国产河豚毒素(TTX)单克隆抗体 8A5 有效地拮抗 TTX 对钠流的抑制, 生理学报, 1995, 47(1): 89 ~ 91
- 10 郭慧清、李锦文、黎主政等。联合采用吸附树脂与离子交换树脂提取河豚毒素, 广州师院学报(自然科学版), 1997, 2: 60 ~ 64
- 11 厚生省环境卫生局。食品卫生检测指针 II(日本)。日本: 日本食品卫生协会, 1978。
- 12 Andreas S., Werner V.. Tetrodotoxin-resistant action potentials in dorsal root ganglion neurons are blocked by local anesthetics, *Pain.*, 2000, 89: 47 ~ 52
- 13 Aron J., Neide H. and Jurkiewicz. TTX-sensitive Na^+ and nifedipine-sensitive Ca^{2+} channels in rat vas deferens smooth muscle cells, *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1999, 1419: 343 ~ 352
- 14 Bernard C., Pierre P. and Jean C.. Beauvillain. Noradrenaline modulates GABA mediated synaptic transmission in neurones of the mediolateral part of the guinea pig lateral septum via local circuits, *Neuroscience Research*, 2001, 39: 71 ~ 77
- 15 Borison H. L. & McCarthy L. E.. Respiratory and circulatory effects of saxitoxin in the cerebrospinal fluid, *Br. J. Pharmacol.*, 1977, 61: 697 ~ 701
- 16 Chang FC T.. Respiratory and cardiovascular effects of tetrodotoxin in urethane anesthetized guinea pigs, *Brain Res.*, 1990, 528(2): 259 ~ 265
- 17 Chu F. S. and Fan T. L.. Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for saxitoxin in shellfish, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1985, 68: 13 ~ 16
- 18 Davio S. R.. Progress toward development of monoclonal antibodies to saxitoxin. In: Toxic dinoflagellates. Antigen preparation and antibody detection. New York: Elsevier, 1985. 343 ~ 346
- 19 Fozzard H.A. & Lipkind G.. The guanidinium toxin binding site on the sodium channel, *Jpn Heart J.* 1986, 37: 683 ~ 686
- 20 Hill B.. The receptor for tetrodotoxin and saxitoxin, a structure hypothesis, *Biophys J.*, 1975, 15: 615 ~ 617
- 21 Jan M. M., George G. N., Karin H. B. et al.. Differential actions of dizocilpine (MK801) on the mesolimbic and mesocortical dopamine systems: role of neuronal activity, *Neuropharmacology*, 1999, 38: 121 ~ 128
- 22 Jeffrey W. G. and Ronald E. S.. Dissociation of primary and secondary reward-relevant limbic nuclei in an animal model of relapse, *Neuropsychopharmacology*, 2000, 22: 473 ~ 479
- 23 Kao C. Y.. Structure activity relation of tetrodotoxin, saxitoxin, and analogues, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1986, 479: 52 ~ 59
- 24 Kigure K.. A tissue culture assay for tetrodotoxin, saxitoxin and related toxins, *Toxicon.*, 1988, 26: 191 ~ 197
- 25 Kushmericka C., Mesquita F. de C. and Mariab M.. Effects of a *Lasiadora* spider venom on Ca^{2+} and Na^+ channels, *Toxicon.*, 2001, 39: 991 ~ 1002
- 26 Liu X., Zhou J. L. and Chung K.. Ion channels associated with the ectopic discharges generated after segmental spinal nerve injury in the rat, *Brain Research*, 2001, 900: 119 ~ 127
- 27 Lombet A.. Na^+ channels with binding sites of high and low affinity for tetrodotoxin in different excitable and nonexcitable cells, *Eur. J. Biochem.*, 1982, 124: 199 ~ 202
- 28 Ludovic G., Marianne G. and Marek L.. Calcium waves in frog melanotrophs are generated by intracellular inactivation of TTX-sensitive membrane Na^+ channel, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2000, 170: 197 ~ 209
- 29 Michael E., Eva G.. Role of voltage-dependent Na^+ channels for rhythmic Ca^{2+} signalling in glucose-stimulated mouse pancreatic β cells, *Cell. Signal.*, 1999, 11(5): 343 ~ 348
- 30 Susan E., Boehnke and Douglas D.. Time course and effective spread of lidocaine and tetrodotoxin delivered via microdialysis: an electrophysiological study in cerebral cortex, *Journal of Neuroscience Methods*, 2001, 105: 133 ~ 141
- 31 Ubricht W., Wagner H. H. & Schmidt-mayer J.. Kinetics of TTX-STX block of sodium channels, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1986, 479: 68 ~ 83
- 32 Williams S.. Official methods of the Associate of Official Analytical Chemists. 14th Ed. Arlington, Virginia: AOAC, 1984. 344 ~ 347
- 33 Yasumoto T., Yotsu M., Murata M. et al.. New tetrodotoxin analogues from the newt *Cynops ensicauda*, *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, 110: 2344 ~ 2346
- 34 Yotsu M.. Production of tetrodotoxin and its derivatives by *Pseudomonas* sp. Isolated from the skin of a pufferfish, *Toxicon.*, 1987, 25: 225 ~ 228

(本文编辑: 刘珊珊)