

卡罗藻毒素研究进展

A review of karlotoxins

许亚如, 何山, 周成旭, 严小军

(宁波大学 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江宁波 315211)

中图分类号: P745 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2014)10-0113-06

doi: 10.11759/hyxx20130819001

剧毒卡罗藻 *Karlodinium veneficum* (又称 *Karlodinium micrum*) 作为一种典型的赤潮种, 是海水养殖水域和自然水体中一种常见的裸甲藻种类, 为混合营养型生物。该藻自 20 世纪 50 年代被发现以来, 在过去的 60 年中其命名曾发生过多次变更, 直到最近将其归入裸甲藻种类, 被译为剧毒卡罗藻^[1] (也有学者命名为剧毒卡尔藻^[2])。该藻自首次在南非被发现以来, 美国南卡罗来纳州海域、切萨皮克湾、马里兰州海湾甚至欧洲、澳洲、南美洲等多处都发生大规模赤潮, 造成大量鱼类死亡^[3-7]。进入 21 世纪, 国内也频频出现剧毒卡罗藻赤潮的相关报道。香港水域曾于 2003 年形成该藻高密度赤潮。2005 年 6 月, 浙江海区暴发大规模的米氏凯伦藻 (*Karenia mikimotoi*) 和东海原甲藻 (*Prorocentrum donghaiense*) 混种赤潮水样中也检测到该藻^[8]。Zhou 等^[9] 首次对中国东海分离的一株剧毒卡罗藻进行了系列毒性检测, 结果显示该藻细胞内外提取物均表现出不同强度的溶血性、鱼毒性、细胞毒性和胚胎毒性。该株剧毒卡罗藻的毒性还与种群生长期相关^[10-11]。位于中国东海海区的象山湾养殖区等水样中常检出该藻或已经出现高密度生物量; 山东半岛最东端的桑沟湾还爆发了高密度的单种剧毒卡罗藻赤潮, 导致鱼虾大量死亡^[12]。近年来, 随着对该藻的关注度提高, 对我国海域的剧毒卡罗藻的种类描述和监测也有所增加^[13]。

近年来, 在卡罗藻毒素 (也称卡尔藻毒素^[2]) 的化学结构、生物活性以及生物合成基因等方面的研究取得了很大进展。该藻中分离得到的该类海洋生物毒素卡罗藻毒素 (Karlotoxins, 简称 KmTxs) 具有溶血性、鱼毒性、细胞毒性和胚胎毒性等多种毒性特征^[3, 9]。通过分泌该种毒素, 剧毒卡罗藻不仅可以抵御其他生物的猎食行为^[14], 还可利用其毒性麻痹猎物进行捕

食^[15]。目前海洋生物毒素以其独特的化学结构和高生物活性, 已成为国内外海洋药物研究的热点, 因此本文就卡罗藻毒素研究的进展情况进行了综述。

1 卡罗藻毒素的发现

早在 1957 年 Abbott 和 Ballantine 就提出, 剧毒卡罗藻 (最初被称作 *Gymnodinium veneficum*) 可产生某些有毒化合物, 该毒素分子质量较大, 不能透过透析膜; 可溶于水和低醇溶液, 却不能溶于乙醚和氯仿; 酸性条件下很不稳定, 但在中性溶液中具有一定的热稳定性; 可致使攻击目标的神经膜和肌肉膜去极化以达到毒性效应, 他们也提出其作用机制可能是毒素促使钠离子快速通过细胞膜通道进入细胞, 从而干扰了钠离子的交换^[16]。以上描述的许多毒素特征在得到卡罗藻毒素单体化合物后都得到了证实。

但是从提出剧毒卡罗藻中的毒素物质到卡罗藻毒素单体化合物被证实, 这之间却经历了将近半个世纪。Deeds 等^[17] 首次证实了剧毒卡罗藻中具有溶血性、鱼毒性以及细胞毒性的有毒化合物, 并指出该化合物的毒理特征与剧毒卡罗藻赤潮引发鱼死亡特征是一致的。他们从切萨皮克湾分离到的剧毒卡罗藻 (当时称作 *K. micrum*) 中纯化得到了两种毒性物质, 命名为 Tox A 和 Tox B。在虹鲟鱼红细胞溶血研究中发现, 这两种物质都具有强烈的溶血活性, 其中 Tox A 的 IC₅₀ 达到 284 μg/L, Tox B 为 600 μg/L, 而标准

收稿日期: 2013-08-19; 修回日期: 2013-10-18

基金项目: 浙江省自然科学基金项目 (LQ13B020004); 高等学校博士点基金 (20133305120007)

作者简介: 许亚如 (1987-), 女, 河北沧州人, 硕士研究生, 从事海洋毒素研究, E-mail: XuYaRulovelife@163.com; 何山, 通信作者, 广东韶关人, 博士, 副教授, 从事海洋天然产物与生物技术研究, E-mail: heshan@nbu.edu.cn

溶血素的 IC₅₀ 则为 3203 μg/L。同时也证实了这两种物质具有鱼毒性和细胞毒性。他们分别用复合铜灭藻剂和高锰酸钾处理剧毒卡罗藻藻体, 结果表明两种方法都可以使 70% 以上的藻体溶解, 但用复合铜灭藻剂处理组该毒素被释放到藻液中并保持活性, 而用高锰酸钾处理组毒素的活性丧失。在切萨皮克湾 HyRock 渔场发生剧毒卡罗藻赤潮时, 采用复合铜灭藻剂处理水样比用高锰酸钾处理引发了更高的鱼致死率, 这说明该化合物的毒理特征与剧毒卡罗藻赤潮引发鱼死亡特征是一致的。

2002 年(Deeds 等证实卡罗藻毒素存在的同一年)南卡罗来纳州的一个咸水池中暴发了细胞密度高达 6×10⁴ 个/mL 的剧毒卡罗藻赤潮并引发鱼类大量死亡, Kempton 等收集了该水样并对其滤液和滤液 80% 甲醇洗脱部位的溶血性和鱼毒性进行了检测, 结果显示, 该水样滤液及其洗脱部位都具有较高的溶血活性(>80%); 应用 HPLC 技术分离得到了具有较高溶血活性的物质, 该物质对斑马鱼稚鱼产生了急性致死效应。Kempton 发现该活性部位的生化特性与 Deeds 等分离得到的 Tox A 相同, 将这两种物质混合后进行 HPLC 分析, 发现这两种物质的保留时间和

紫外吸收并不相同^[3]。对这两个活性部位进一步研究, 最终发现了两种卡罗藻毒素单体化合物。至 2010 年, 有 3 种卡罗藻毒素获得了完整的波谱数据, 但通过高分辨 LC-TOF MS 技术推断出了 7 种卡罗藻毒素的结构^[18-21]。

2 卡罗藻毒素的化学结构

卡罗藻毒素是结构独特的聚酮类化合物^[3], 与前沟藻属甲藻产生的 amphidinols(AMs)结构^[22]相似。其独特的“发夹式”结构(图 1), 主要包括三个部分: I. 一条多羟基链; II. 含有两个六元醚环的“转折区域”; III. 末端为共轭二烯结构的脂链(AMs 的脂链末端往往为共轭三烯), 该结构赋予了卡罗藻毒素独特的紫外吸收。

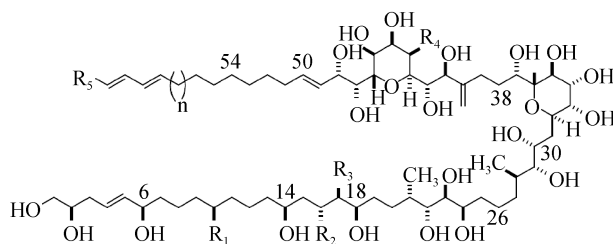


图 1 卡罗藻毒素的化学结构

表 1 目前报道的卡罗藻毒素的家族化合物

命名	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	n	分子式	分子质量	发表年份
KmTx 1	OH	CH ₃	OH	H	H	4	C ₆₉ H ₁₂₆ O ₂₄	1338.9	2008
65-E-Cl-KmTx 1	OH	CH ₃	OH	H	Cl	4	C ₆₉ H ₁₂₅ ClO ₂₄	1372.8	2010
10-SO ₄ -KmTx 1	SO ₄	CH ₃	OH	H	H	4	C ₆₉ H ₁₂₅ SO ₂₇	1417.8	2010
KmTx 2	OH	CH ₃	OH	H	Cl	2	C ₆₇ H ₁₂₁ ClO ₂₄	1344.8	2008、2010
KmTx 3	OH	CH ₃	OH	H	H	3	C ₆₈ H ₁₂₄ O ₂₄	1324.8	2008
64-E-Cl-KmTx 3	OH	CH ₃	OH	H	Cl	3	C ₆₈ H ₁₂₃ ClO ₂₄	1358.8	2010
10-SO ₄ -KmTx 3	SO ₄	CH ₃	OH	H	H	3	C ₆₈ H ₁₂₃ SO ₂₇	1403.8	2010

最初, Deeds 等^[4]根据卡罗藻毒素的最大紫外吸收、毒素效应以及地理分布的不同将其划分为两类: KmTx 1^[17]和 KmTx 2^[3]。在切萨皮克湾内部发现的 KmTx 1 最大紫外吸收为 225 nm, 而切萨皮克湾南部发现的 KmTx 2 最大紫外吸收为 235 nm。对比 KmTx 1 和 KmTx 2 的化学结构可以知道, 由于末端二烯的氯取代基导致了 KmTx 2 家族化合物的吸收光谱红移。这两类化合物的脂链长度也存在差异, KmTx 1 中存在 18 个碳, 而 KmTx 2 家族则只有 16 个碳。与其不同的, KmTx 3 家族化合物的脂链中含有奇数个碳, 表明该类化合物有着不同的生物合成途径^[1]。

Bachvaroff 等^[18]从北美的两株剧毒卡罗藻中纯化出 3 种卡罗藻毒素单体化合物(KmTx 1-1, KmTx

1-3 和 KmTx 2), 并首次应用高效液相色谱和质谱联用技术(High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, 简称 HPLC-MS)推导出其化学分子式(KmTx 1-1, 1308.8210, C₆₇H₁₂₀O₂₄; KmTx 1-3, 1322.8637, C₆₉H₁₂₆O₂₃; KmTx 2, 1344.7938, C₆₇H₁₂₁ClO₂₄)。正离子模式下, 这 3 个化合物的主信号峰的质荷比 *m/z* 分别为 1347.9(KmTx 1-1 [M+ONa]⁺), 1361.9(KmTx 1-3 [M+ONa]⁺)和 1367.8(KmTx 2 [M+Na]⁺)。为了进一步定性描述三种化合物, 运用 MSⁿ 模式阐述了质谱碎裂规律。结果表明, 两大家族卡罗藻毒素的质谱碎裂规律具有高度的相似性, 但也存在结构上的差异。他们将卡罗藻毒素的分子结构假定为线性结构, 并绘出了其 MSⁿ 碎裂规律原理图(图 2)。结果显示,

两大家族 KmTx 有着相同分子质量(897.6 amu 或 914.7 amu)的主离子碎片信号峰,且均存在相差 16 amu(推断为氧原子)的信号峰,但不同的是, KmTx 1-1 和 KmTx 1-3 中该假定氧原子出现在“左端”(897.6 amu 对应 914.7 amu),而 KmTx 2 则出现在“右端”(430.1 amu 对应 446.1 amu)。KmTx 3 与羟基化的 KmTx 1-1 有着相似的分子质量和串联质谱碎裂模式。

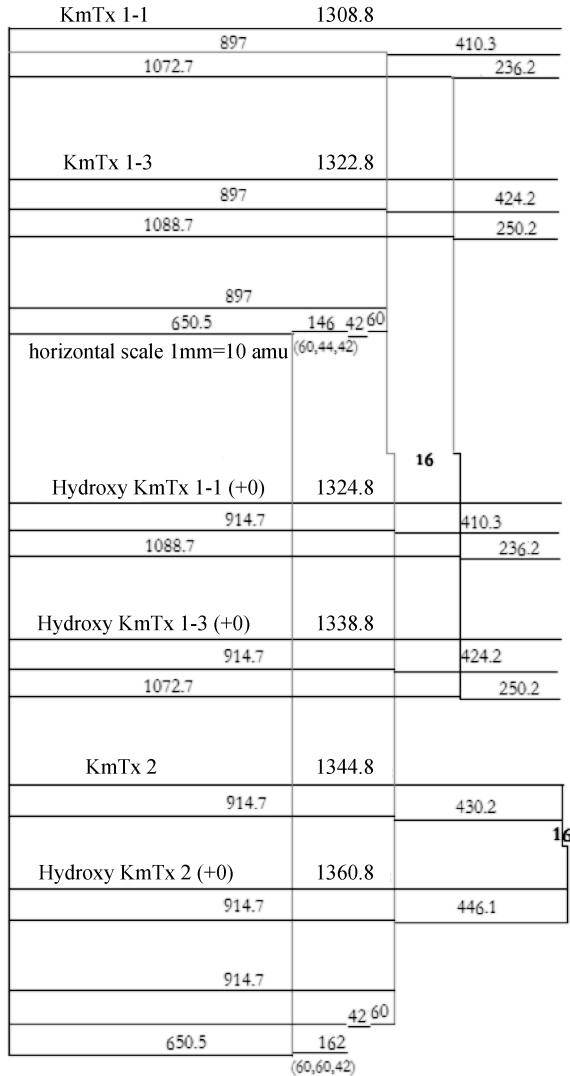


图 2 卡罗藻毒素假定线性结构 MSⁿ 碎裂规律原理图^[18] 横线表示分子质量,纵线表示不同卡罗藻毒素可能的相同碎裂点

3 卡罗藻毒素的生物活性

卡罗藻毒素复杂的化学结构赋予了其独特的毒性特征。无论是人工培养还是从自然水体中分离得到的卡罗藻毒素,都表现出溶血性、鱼毒性、细胞

毒性和胚胎毒性等多种毒性特征。毒性机理研究发现,卡罗藻毒素分子的两性结构,可与细胞膜磷脂双分子层直接作用,形成离子渗透孔隙、破坏细胞的渗透平衡,导致细胞死亡^[15]。Houdai 等^[23]也曾推测,AMs 的“发夹式”结构是导致细胞死亡的毒性机制。脂链首先与细胞膜磷脂双分子层结合,脂链越长与膜的亲和力越强;亲水链决定膜孔的大小;而中心部位,即“转折区域”,以氢键的形式紧密连接亲水链和疏水链,在两性环境中保持分子的稳定性。

同时,研究发现卡罗藻毒素可对某些共生浮游植物甚至脊椎动物产生毒性效应,但对其自身却无任何毒副作用。进一步的毒性机理研究发现,卡罗藻毒素致死鱼类的主要作用部位是鱼的鳃部^[24],且其毒性效应是有选择性的,主要依赖于靶细胞膜上的甾醇成分。Peng 等^[21]指出,卡罗藻毒素是一种特异性甾醇导向毒素,具有强力的膜透化活性,可在生物膜上穿孔,这种活性特征与 amphotericin B 和 amphidinol 3^[23]相似。并指出该毒素与各甾醇的结合性强弱依次为菜籽甾醇(brassicasterol)>胆固醇(cholesterol)>麦角固醇(ergosterol)>gymnodinosterol(剧毒卡罗藻细胞膜的主要甾醇)。细胞膜上的 4-甲基甾醇类物质(剧毒卡罗藻自身细胞膜的主要甾醇)可与卡罗藻毒素形成稳定的复合物,将毒素隔绝保护自身,而含有类似于胆固醇(脱甲基甾醇)的细胞则没有这种保护作用,成为被攻击的对象,如海洋尖尾藻^[24-25]。通过分泌该种毒素,剧毒卡罗藻不仅可以抵御其他生物的猎食^[14],还可利用毒素麻痹猎物进行捕食^[15],直接影响自身生境食物网。这种吞噬营养行为在剧毒卡罗藻的营养获取以及赤潮发生和发展中可能发挥着重要作用。

4 卡罗藻毒素的潜在药用价值

海洋是生命的发源地,由于高压、高盐和纷繁复杂的地质变化,在几十亿年的演化过程中孕育出了丰富多彩海洋生物世界,是大自然赋予天然产物化学家进行药物研发的新领域。海洋生物毒素是有毒海洋生物分泌的一类特殊代谢产物,其奇特的化学结构和高活性已日益成为国内外海洋药物研究的热点^[26]。海洋毒素的药用价值得到了科研界的重视,许多海洋生物毒素已进入临床研究阶段,其中,芋螺毒素作为镇痛药物已获批,成为海洋药物研发的成功案例^[27]。然而每种可能成为药物的毒素其药理却相差很大。在研究卡罗藻毒素的毒性特征及其致

毒机理时发现, 卡罗藻毒素对靶细胞膜上的甾醇成分有特异的选择活性, 对胆固醇有较强的结合能力^[23]。该特性在研究剧毒卡罗藻捕食效应方面的多个研究中得到证实^[24-25, 28]。

胆固醇是人体组织细胞和细胞膜不可缺少的重要组成物质。不仅参与细胞膜的形成, 还是很多重要维生素和激素的先导物质^[29], 并通过参与脂筏的相关作用引发多种人类健康疾病。脂筏是细胞膜的重要组成部分, 由鞘脂类、胆固醇和其他蛋白质组成^[30], 其中胆固醇作为粘合剂紧密连接鞘脂类和蛋白质, 维持脂筏的正常生物功能。脂筏在细胞膜分选与运输, 细胞生长、存活和死亡以及 T(B)细胞的信号转导、过敏反应中都扮演着重要角色^[31], 一旦胆固醇被抽离, 脂筏将崩溃, 细胞功能受损甚至丧失。冠心病(CHD)是与胆固醇相关的人类健康疾病, 能引发心脏病、中风、充血性心力衰竭甚至死亡。在美国, 冠心病是死亡的首要原因。低密度脂蛋白(LDL)和高密度脂蛋白(HDL)作为运输胆固醇的两种主要脂蛋白, 已成为人体健康问题的重要标志。

卡罗藻毒素作为一种新型的甲藻毒素虽然显示出强烈的溶血性和鱼毒性, 但是 Waters 等^[32]提出, 该化合物独特的化学结构和特异性甾醇导向活性可作为先导化合物用于新药设计研究。他们提出了设想, 卡罗藻毒素可作为一种新型的潜在 HDL 模型结构, 合成一种无毒的胆固醇药效团, 将动脉中的胆固醇运输至肝脏或肾脏排出体外, 以治疗与胆固醇有关的心脏病、癌症等人类健康疾病。

5 卡罗藻毒素的生物合成基因

Bachvaroff 等^[33]研究表明, 卡罗藻毒素的合成持续整个生长周期, 而毒素产量却是高度可变的, 每个藻体的毒素含量从不可检测到微微克水平。Mooney 等^[34]对可产生鱼毒素的海洋甲藻(*Karenia*, *Karlodinium* 和 *Takayama*)中 8 种脂质类、脂肪酸及甾醇成分进行了研究, 结果发现, 甾醇和甾酮类化合物的生物合成间存在一种生物化学联系, 并提出, 这些所选海洋甲藻可能是海底沉积物中的酮类化合物的重要来源。Kempton 等^[3]证实了卡罗藻毒素是结构独特的聚酮类化合物。聚酮类化合物的碳骨架由多聚酮合酶(polyketone synthetase, PKS)催化形成, 因此卡罗藻毒素很可能来源于 PKS 途径^[35]。游玉容等^[10]首次从非无菌培养的东海原种剧毒卡罗藻宏基因组 DNA 中扩增得到了 PKS 基因片段, 并通过

BLAST 比对和系统发生树分析, 得出该基因对应的氨基酸序列与纤维多囊菌 PKS 的 KS 结构域有 60%的同源性和较近的系统发生关系, 为该株剧毒卡罗藻可能存在聚酮类化合物卡罗藻毒素提供了分子依据。

早在 20 世纪末, 已有研究人员开展了聚酮合成途径的研究, 并从细菌和真菌中克隆出大量的聚酮生物合成途径基因, 为阐明这些结构独特的聚酮类衍生物的合成机制提供了巨大的可能性^[36-37]。同时, 组合生物合成技术的应用研究, 即甲藻中聚酮类衍生物生物合成基因在异源宿主中的功能性表达, 也激发了广大学者对获得大量稀有或结构新颖的聚酮类化合物的研究热情^[38]。然而, 从基因水平上研究卡罗藻毒素的合成途径仍存在以下 3 个方面的困难: I. 甲藻拥有庞大的基因组, 细胞核中拥有多达 200 pg DNA^[39]; II. 缺乏转录调控系统; III. 卡罗藻毒素产量很低, 且易受外界环境的影响而变化甚至消失^[40]。因此从基因水平上研究卡罗藻毒素, 仍存在巨大的挑战。

6 结论与展望

剧毒卡罗藻赤潮在世界范围内频频暴发给海洋经济带来了严重危害, 但由于其体型微小(<8~12 μm), 光学显微镜下观察其外观形态与无毒的海湾裸甲藻(*Gyrodinium estuariales*)极易混淆^[41]。此外, 由于种和亚种间的多样性以及不同生境下藻类毒素代谢的差异, 使藻类自身在具体情况下存在有毒株与无毒株的差异。因此, 多年来在赤潮常规监测和研究中长期被忽略。尽管近年来取得了突破性的研究进展。从基因水平上研究卡罗藻毒素的生物合成调控, 因多方面的原因仍存在较大困难。而美国海洋生物技术研究中心的 Place 研究小组报道的 HPLC/MS 技术^[19]是关于 KmTxS 检测方法的唯一文献, 但该方法采用常规的 5 μm 反相 C-18 色谱柱分离, 存在分离效果不是很好、分辨率低、结构推导准确性较低等问题。目前提出一种新兴的液-液分配色谱技术, 即高速逆流色谱技术(High Speed Countercurrent Chromatography, HSCCC)可完全避免传统技术因不可逆吸附而引起的样品污染、变性、失活等问题, 简化了样品预处理的工序, 且回收率高达 90%以上^[42]。HSCCC 已广泛用于植物化学成分(尤其是中草药有效成分)的制备性高效分离, 但在海洋天然产物分离纯化中的应用报道较少。为了赤潮预警和可能存在的食品安全问题, 应建立卡罗藻毒素快速、高灵敏、高效的制备检测方法。此外, 我们建议加大对卡罗藻毒素药理

活性的研究投入,同时研究高效制备分离技术以获得更多量的高纯度标准品用于进一步研究。

参考文献:

- [1] Place A R, Bowers H A, Bachvaroff T R, et al. *Karlodinium veneficum*-The little dinoflagellate with a big bite[J]. Harmful Algae, 2012, 14: 179-195.
- [2] 王红霞, 陆斗定, 黄海燕, 等. 东海剧毒卡尔藻的形态特征及其系统进化分析[J]. 植物学报, 2011, 46(2): 179-188.
- [3] Kempton J W, Lewitus A J, Deeds J R, et al. Toxicity of *Karlodinium micrum* (Dinophyceae) associated with a fish kill in a South Carolina brackish retention pond[J]. Harmful Algae, 2002, 1(2): 233-241.
- [4] Deeds J R, Kibler S R, Tester P A, et al. Geographic strain variation in toxin production in *Karlodinium micrum* (Dinophyceae) from Southeastern estuaries of the United States[J]. Harmful Algae, 2002b, 145-147.
- [5] Hallegraeff G M. Aquaculturists' guide to harmful Australian microalgae[M]. Hobart, Australia, Print Centre: 2002.
- [6] Bjornland T, Tangen K. Pigmentation and morphology of a marine Gyrodinium (Dinophyceae) with a major carotenoid different from peridinin and fucoxanthin[J]. Journal of Phycology, 1979, 15: 457-463.
- [7] Tengs T, Bowers H A, Ziman A P, et al. Genetic polymorphism in *Gymnodinium galatheanum* chloroplast DNA sequences and development of a molecular detection assay[J]. Molecular Ecology, 2001, 10: 515-523.
- [8] 周成旭, 孙雪, 冯婧, 等. 源于中国东海的有毒裸甲藻 *Karlodinium micrum* 的显微观察和分子鉴定[J]. 海洋通报, 2008, 3(27): 32-37.
- [9] Zhou C X, Fernández N, Chen H M, et al. Toxicological studies of *Karlodinium micrum* (Dinophyceae) isolated from East China Sea[J]. Toxicon, 2010, 57(2011): 9-18.
- [10] 游玉容, 周成旭, 朱鹏, 等. 非无菌培养的微小卡罗藻次生代谢产物的细胞毒及其宏基因组酮基合成酶基因的筛选[J]. 生物技术通讯, 2007, 18(6): 961-963.
- [11] 周成旭, 傅永静, 陈清峰, 等. 微小卡罗藻溶血活性的生长期特征及其溶血毒素种类分析[J]. 海洋学报, 2009, 2(31): 146-151.
- [12] 徐娜, 逢少军, 刘峰. 一株桑沟湾赤潮藻的分子鉴定[J]. 海洋科学, 2012, 36(4): 13-18.
- [13] Wang H X, Lu D D, Huang H Y, et al. First observation of *Karlodinium veneficum* from the East China Sea and the coastal waters of Germany[J]. Acta Oceanol. Sin., 2011, 30(6): 112-121.
- [14] Hong J R, Talapatra S, Katz J, et al. Algal toxins alter copepod feeding behavior[J]. PloS one, 2012, 7(5): e36845.
- [15] Sheng J, Malkiel E, Katz J, et al. A dinoflagellate exploits toxins to immobilize prey prior to ingestion[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010, 107(5): 2082-2087.
- [16] Abbott B, Ballantine D. The toxin from *Gymnodinium veneficum* Ballantine[J]. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 1957, 36(1): 169-189.
- [17] Deeds J R, Terlizzi D E, Adolf J E, et al. Toxic activity from cultures of *Karlodinium micrum* (=Gyrodinium galatheanum)(Dinophyceae)-a dinoflagellate associated with fish mortalities in an estuarine aquaculture facility[J]. Harmful Algae, 2002a, 1(1): 169-189.
- [18] Bachvaroff T R, Adolf J E, Squier A H, et al. Characterization and quantification of karlotoxins by liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Harmful Algae, 2008, 7(4): 473-484.
- [19] Place A R, Deeds J R. Dinoflagellate karlotoxins, methods of isolation and uses thereof. US. 2005/0209104 A1[P]. 2005-9-22.
- [20] Peng J N, Hill R, Place A R, et al. Marine microbes: the critical role they play in sustainable production of starting materials for the synthesis of drug leads and the structure for the elusive Pfiesteria-associated fish killing toxin using ¹³C enrichment and dual cryoprobe NMR studies[J]. Papers, United States: 2007, 25-29.
- [21] Peng J N, Place A R, Yoshida W, et al. Structure and absolute configuration of karlotoxin-2, an ichthyotoxin from the marine dinoflagellate *Karlodinium veneficum* [J]. Journal of the American Chemical Society, 2010, 132(10): 3277-3279.
- [22] Satake M, Murata M, Yasumoto T, et al. Amphidinol, a polyhydroxy-polyene antifungal agent with an unprecedented structure, from a marine dinoflagellate, Amph-

- idinium klebsi[J]. Journal of the American Chemical Society, 1991, 113(26): 9859-9861.
- [23] Houdai T, Matsuoka S, Morsy N, et al. Hairpin conformation of amphidinols possibly accounting for potent membrane permeabilizing activities[J]. Tetrahedron, 2005, 61(11): 2795-2802.
- [24] Deeds J R and Place A R. Sterol-specific membrane interactions with the toxins from *Karlodinium micrum* (Dinophyceae)-a strategy for self-protection[J]. African Journal of Marine Science, 2006, 28(2): 421-425.
- [25] Place A R, Bai X M, Kim S J, et al. Dinoflagellate host-parasite sterol profiles dictate karlotoxin sensitivity[J]. Journal of Phycology, 2009, 45(2): 375-385.
- [26] 李勇, 杨雁, 史清文, 等. 海洋毒素研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2011, 23(3): 582-589.
- [27] Ekberg J, Craik D J, Adams D J. Conotoxin modulation of voltage-gated sodium channels[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2008, 40(11): 2363-2368.
- [28] Adolf J E, Krupatkin D, Bachvaroff T, et al. Karlotoxin mediates grazing by *Oxyrrhis marina* on strains of *Karlodinium veneficum*[J]. Harmful Algae, 2007, 6: 400-412.
- [29] Berg J, Tymoczko J, Stryer L. The Biosynthesis of Membrane Lipids and Steroids[C]// W H Freeman. Biochemistry, 2002, chapter, 26.
- [30] Michel V, Bakovic M. Lipid rafts in health and disease[J]. Biology of the Cell, 2007, 99(3): 129-140.
- [31] Simons K, Ehehalt R. Cholesterol, lipid rafts and disease[J]. Journal of Clinical Investigation, 2002, 110(5): 597-603.
- [32] Waters A L, Hill R T, Place A R, et al. The expanding role of marine microbes in pharmaceutical development[J]. Current opinion in biotechnology, 2010, 21(6): 780-786.
- [33] Bachvaroff T R, Adolf J E, Place A R. Strain variation in *Karlodinium veneficum* (dinophyceae): toxin profiles, pigments and growth characteristics[J]. Journal of Phycology, 2009, 45(1): 137-153.
- [34] Mooney B D, Nichols P D, De Salas M F, et al. Lipid, fatty acid and sterol composition of eight species of Kareniaceae (dinophyta): chemotaxonomy and putative lipid phycotoxins[J]. Journal of Phycology, 2007, 43(1): 101-111.
- [35] Rein K S, Borrone J. Polyketides from dinoflagellates: origins, pharmacology and biosynthesis[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 1999, 124(2): 117-131.
- [36] Hopwood D A. Genetic contributions to understanding polyketide synthases[J]. Chemical Reviews, 1997, 97(7): 2465-2498.
- [37] Wang I K, Reeves C, Gaucher G M. Isolation and sequencing of a genomic DNA clone containing the 3'terminus of the 6-methylsalicylic acid polyketide synthetase gene of *Penicillium urticae*[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1991, 37(1): 86-95.
- [38] Khosla C. Harnessing the biosynthetic potential of modular polyketide synthases[J]. Chemical Reviews, 1997, 97(7): 2577-2590.
- [39] Rizzo P. Biochemistry of the dinoflagellate nucleus[J]. The biology of dinoflagellates, 1987, 143-173.
- [40] Shimizu Y. Microalgal metabolites[J]. Chemical Reviews, 1993, 93(5): 1685-1698.
- [41] ECOHAB: Consequences and causes of variable toxicity in *Karlodinium micrum*-a cosmopolitan ichthyotoxic dinoflagellate[EB/OL]. <http://www.nos.noaa.gov/nccos/npe/projectdetail>.
- [42] Conway W D. Counter-current chromatography[J]. Chromatogr. A, 1991, 538: 27-35.

(本文编辑: 康亦兼)