

综述

微囊藻毒素分子致毒机理研究近况

徐立红 张甬元

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

RECENT DEVELOPMENTS IN THE STUDY OF THE MOLECULAR INTOXICATION MECHANISM OF MICROCYSTINS

Xu Lihong and Zhang Yongyuan

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

关键词 微囊藻毒素, 蛋白磷酸酶, 促肿瘤作用

Key words Microcystins, Protein phosphatase, tumor promotion

目前, 日趋严重的水体富营养化使水华发生已成为全球性环境问题, 产生水华的藻类因而也受到越来越多的重视。海洋赤潮中甲藻所产生的毒素已引起人类的严重的中毒事件^[1,2], 虽然淡水水华还未发现引起人类急性中毒事件, 但由于饮用发生水华水体的水而导致家畜、家禽及野生动物死亡的事件频繁发生^[3,4], 淡水水华已引起科学家的关注。微囊藻是淡水水体水华中最常见的藻, 微囊藻毒素(Microcystins, 简写 MCYST)是蓝藻的微囊藻属、鱼腥藻属、颤藻属及念珠藻属的某些品系或种中产生的次生代谢物^[5-8], 水华的普遍发生使 MCYST 成为了一种存在广、影响大的天然毒物, 因而各国科学家已从藻类学、环境科学及流行病学等领域对 MCYST 进行系统研究。早期工作包括毒素分离、纯化, 毒素分子量及结构的确定, 毒素毒性作用的测定以及毒素作用机制的探讨等等, 近几年来, 从细胞水平、生化水平上的研究包括确定毒素作用的分子靶位, 毒素和靶位间作用方式及过程。

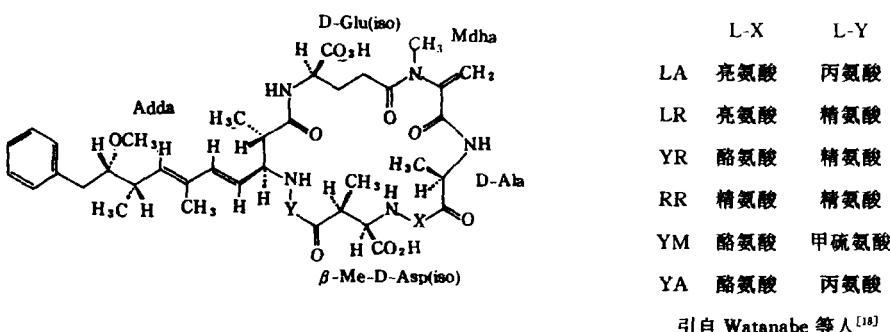
MCYST 研究概况

微囊藻毒素在 1959 年首次被确定为肽毒素^[9], 随后从不同藻中分离出了性质、组成极为相似的藻毒素, 到 80 年代对其结构才有了明确的了解。微囊藻毒素是一组环状七肽物质, 一般结构为: 环(D-丙氨酸-L-X-赤-β-甲基-D-异天冬酸-L-Y-Adda-D-异谷氨酸-N-

* 淡水生态与生物技术国家重点实验室资助。

1993 年 2 月 9 日收到。

甲基脱氢丙氨酸)^[10,11],其中 N-甲基脱氢丙氨酸(Mdha)为一种特殊氨基酸,含有 α, β 不饱和双键;Adda 为一种特殊氨基酸,结构为 3-氨基-9-甲氧基-2,6,8-三甲基-10-苯基-4,6-二烯酸,X,Y 为两种可变的 L 氨基酸,由于 X,Y 不同而产生多种 MCYST,至少有二十多种已被分离^[12]。存在最普遍,含量也相对较多,毒性大的是 LR,RR 和 YR,其中 L,R,Y 分别代表亮氨酸,精氨酸,酪氨酸。目前分离的阐明结构的 MCYST 均含有 Adda 部分,毒性实验显示 Adda 结构改变则毒性丧失,证明 Adda 对 MCYST 的活性是必需的^[13,14]。MCYST 的一般结构及几种 MCYST 的组成如图一所示:



接触降低。这些作用仅限于肝细胞,同样剂量对其它细胞无影响,可能是肝的代谢活化起作用,最严重的是大面积肝出血和肝坏死而导致动物死亡^[20-23]。更需引起人类警惕的是它的另一生物活性,即促肿瘤作用,近几年研究发现 MCYST 由于抑制生物体内蛋白磷酸酶 1 和 2A 而成为一种具有大田软海绵酸途径的促肿瘤剂,而且是迄今已发现的最强的肝肿瘤促进剂。

MCYST 促肿瘤作用研究

MCYST 在肿瘤形成中的作用的确定是近几年对藻毒素研究的重要成就。MCYST 不直接作用于 DNA,而是通过干扰细胞内磷酸化的平衡而促进肿瘤的发展。

(一)蛋白磷酸酶及两种促肿瘤途径

蛋白磷酸酶(Protein phosphatase,简写 PP)广泛存在于细胞中,对任何一种蛋白脱磷酸化,不具底物专一性,根据对抑制剂的敏感性和对二价阳离子的依赖性,将其分为三类^[24]:(1) PP1:脱磷酸化酶激酶 β -亚基上的磷酸,两种热稳定的蛋白抑制剂 1,2 使其失活;(2) PP2:脱磷酸化酶激酶 α -亚基上的磷酸,据对阳离子的依赖性又分 A,B,C,其中 B, C 分别需要 $\text{Ca}^{2+}/\text{calmodulin}$ 和 Mg^{2+} ,三种均对抑制剂 1 和 2 不敏感;(3) 只脱 Tyr 残基的磷酸。

蛋白磷酸化与脱磷酸化是细胞内无所不在的反应,正是这两种反应的特定平衡协调着细胞内多种生化反应过程,包括细胞形态的维持,有丝分裂的控制,细胞生长中的基因表达。蛋白功能的调节依赖于磷酸化,磷酸化由蛋白激酶和蛋白磷酸酶的相对活力所控制,一种蛋白的磷酸化状态明显反映出蛋白激酶和蛋白磷酸酶的相对活性^[25],若这两种酶任意一种改变了其相对活性,则由之而来的将是细胞内的一系列生化反应的紊乱。肿瘤发生过程包括起动、促进和肿瘤形成三个步骤,目前的研究发现磷酸化与脱磷酸化平衡的改变将会促进肿瘤形成。蛋白激酶 C 位于质膜上,是一种被 Ca^{2+} 活化,磷脂依赖性的酶,许多蛋白的磷酸化是由蛋白激酶 C 完成的。已知的促癌物豆蔻酸乙酸大戟二萜醇酯(12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate,简称 TPA)是以蛋白激酶 C 为受体的^[26],TPA 类型的促肿瘤剂的作用机制最初可能是诱导蛋白激酶 C 与质膜联接,活化蛋白激酶 C。PP1 与 PP2A 被认为是逆转蛋白激酶 C 的主要酶,因而是正常细胞中肿瘤形成的阻遏物。

大田软海绵酸(Okadaic acid)是由海洋甲藻产生的疏水性的 C38 脂肪酸聚醚类物质,可在贝类、海绵中积累,是引起人的贝类腹泻中毒的主要因素,这也是一种强的肿瘤促进剂,其活力与 TPA 一样强,但是是一种非 TPA 型的促进剂^[27]。它不直接与细胞膜上受体连接以至活化蛋白激酶 C,而是专一性地与细胞液中的 PP1/PP2A 结合,通过抑制 PP1/PP2A 而相对增加了蛋白激酶的活力,即对蛋白激酶的“表观”活化,它是专一性的蛋白磷酸酶抑制剂^[28],以这种方式作为肿瘤促进剂的物质还有六氯环己烷,鹅脱氧胆酸。这种非 TPA 类型的促肿瘤途径被称为大田软海绵酸途径。

(二)MCYST 对 PP1/PP2A 的抑制

1987 年,Runnegar 等人发现了 MCYST 可活化磷酸化酶 a,加之海洋甲藻产生的大田软海绵酸是 PP1/PP2A 的强抑制剂已被证实,这些启发了日本学者 Fujiki 等人,他们

用 MCYST 进行实验,结果发现几种 MCYST 和节球藻毒素(Nodularin)也是极强的 PP1/PP2A 抑制剂,其作用方式与大田软海绵酸的类似,几年来,又有美国、芬兰、日本和澳大利亚等国家的学者就 MCYST 与 PP1/PP2A 之间的作用展开了进一步的研究,证明 MCYST 虽与大田软海绵酸在结构上无相似之处,但就其促肿瘤作用机制而言却十分相似,而且前者作用更强于后者^[29-33],它们对 PP1/PP2A 的抑制作用从下列各方面得到了证实。

1. MCYST 对几种 PP1/PP2A 制备物的作用

Mackintosh 等人进行了比较实验,首先对由兔骨骼肌纯化的 PP1 与 PP2A 的催化亚基进行 MCYST 抑制实验,同时,又将鼠肝、菜籽制成细胞抽提物,用糖原磷酸化酶作为底物,测定 MCYST 对其中 PP1/PP2A 的抑制,结果表明,MCYST-LR 对两类酶制剂的作用趋势、程度均十分类似,IC₅₀值十分接近,说明 LR 与 PP1/PP2A 的作用专一性很强,不因杂蛋白多而影响其相互作用。当毒素与鼠皮肤细胞胞浆中制备的 PP2A 反应时,MCYST-LR,RR,YR 对 PP2A 的抑制作用呈剂量依赖性关系,其中 LR 的 IC₅₀最低,仅 0.8nM,约为大田软海绵酸的三分之一,几种 MCYST 的浓度—酶相对活力曲线与大田软海绵酸的十分接近。

根据 PP1/PP2A 在胞内的一般浓度,LR 对 PP1 和 PP2A 的半抑制浓度,以及 LR 进入体内后在肝脏的分布情况,有人计算出致死剂量的 LR 足可以在短时间内使肝内 PP1/PP2A 全部失活,这样毒素在极短时间内的致死作用就不足为奇了。他们还认为,LR 对 PP1/PP2A 的抑制可以部分解释为什么在有大量蓝藻存在的水体中生物多样性低,而蓝藻由于不具有类似 PP1/PP2A 功能而对 LR 有抗性。

2. MCYST 作用特点

Mackintosh 等人进行的动力学实验表明,当先加入大田软海绵酸后,PP2A 与 LR 的相互作用受到影响,而且 PP1 的专一性抑制剂 1 和抑制剂 2 也影响 LR 与酶的结合。用³H 标记的大田软海绵酸与鼠皮肤细胞液分级保温时,加入未标记的大田软海绵酸与 MCYST-LR,YR,RR 后,³H 标记的大田软海绵酸与 PP1/PP2A 的结合受到抑制,而且抑制趋势与程度十分接近。这证明,尽管 LR 与大田软海绵酸在化学组成及结构上无相似之处,但它们在与 PP1/PP2A 作用时,都结合在酶的同一位点,一种存在则阻止了另一种与酶的结合。当将人的初级成纤维细胞分别与大田软海绵酸和 MCYST-YR 保温时,249nM 的大田软海绵酸在 2h 后引起细胞形态学变化,由纺锤状变为圆形,而 YR 浓度达 9.6μM 时,未引起任何形态学改变。但是,当将 YR 注射进入细胞后,45min 后即使细胞发生了形态学变化,这表明,与大田软海绵酸相比,MCYST 更难以进入这类细胞,表明 MCYST 具有更强的组织专一性。

除此外,MCYST 还具有对 PP2A 作用大于对 PP1 这一与大田软海绵酸相同的特点,并且前者的作用比后者的更强,Honkanen 的实验表明 LR 对 PP1/PP2A 的抑制作用比大田软海绵酸的大 10 倍。

3. MCYST 的不同异构体对 PP1/PP2A 的抑制

不同学者在分离毒素时均分离出了发生几何异构的 MCYST,如在 Adda 的一些部位产生几何异构的 LR,RR 异构体,它们的量很少,命名为 6(Z)-Adda-LR 和 6(Z)-Adda-

RR, Nishiwaki-Matsushima 等人用这些几何异构体进行了关于 PP1/PP2A 的抑制实验, 从分子作用机理上证明发生了几何异构的 MCYST 毒性小于母体 MCYST。他们是从两项实验来证明的。首先, 将 LR, RR, 6(Z)-Adda-LR 和 6(Z)-Adda-RR 分别加至³H 标记的大田软海绵酸与鼠皮肤细胞胞浆混合反应物中, 检验这些毒素抑制大田软海绵酸与胞浆中 PP1/PP2A 结合的情况。结果, LR 与 RR 抑制了标记大田软海绵酸与 PP1/PP2A 的结合, 并呈剂量关系, IC_{50} 分别为 8.0nM 和 7.0nM, 而 6(Z)-Adda LR 和 6(Z)-Adda RR 的这种作用仅为母体物质的十分之一, IC_{50} 分别为 68.0nM 和 130nM。另一项实验是将 6(Z)-Adda LR 和 6(Z)-Adda RR 及 LR, RR 进行 PP2A 抑制实验, 得到的 IC_{50} 分别为 80nM, 80nM, 0.28nM, 0.78nM, 表明发生几何异构的 MCYST 对 PP1/PP2A 的作用明显减弱, 从 MCYST 与酶作用的水平上也证明了 Adda 结构对 MCYST 毒性作用的重要性。

(三) 两阶段致癌研究

用两阶段致癌实验证明 MCYST 促肿瘤作用的报道目前还不多, 这是从肿瘤形成来直接证明 MCYST 与肿瘤发生的关系。两阶段致癌实验检验肿瘤促进活力的标准方法是将致癌物涂布于鼠皮肤诱导乳头状瘤, 然后在用了致癌物的部位再施以待检验的物质, 观察肿瘤生长情况, 与未用待测物的进行比较以确定待测物是否具有促肿瘤活性。为考察 MCYST 是否可能对人产生影响, Fadlconer 等人^[34]对这个方法稍加修改, 将蓝藻抽提物由口服给予实验动物, 一方面这与人可能摄入的方式相同, 另一方面也可判断口头给药是否也具有生物活性。结果证明饮用蓝藻抽提物的鼠皮肤肿瘤重量比对照的要大很多, 这样不仅肯定了蓝藻抽提物的促肿瘤作用, 而且表明由食道进入体内的 MCYST 同样有毒性, 这更应引起人类的警惕。

在 Nishiwaki-Matsushima 等人用小鼠进行的实验中, 用二乙基硝胺(DEN)作为起始剂, 然后用不同剂量 MCYST-LR 进行腹腔注射, 用已知的肝肿瘤促进剂苯巴比妥作为阳性对照, 从几个方面证实了 MCYST 的促肿瘤作用: 用免疫组织化学方法对 GST-P 阳性病灶的百分比与面积进行测定, 发现不用起始剂时, MCYST 不能引起 GST-P 阳性病灶形成; 用了起始剂后, 痘数量与面积呈剂量依赖性增加, 较高浓度 MCYST 可引起更多更大面积的 GST-P 阳性病灶产生, 当 LR 注射量为 50 μ g/kg 时, 鼠肝上产生了大量的大型瘤, 从组织学判断属于赘生瘤。在这个剂量下, 血清丙氨酸氨基转移酶和天冬氨酸氨基转移酶没有变化, 但注射量达 80 μ g/kg 时, 这两种酶立即释放到血液中, 而达 800 μ g/kg 时, 致命的肝内出血导致鼠立即死亡。这些结果反映了毒素的作用最早可从 GST-P 阳性病灶的变化观测到。其它已知的肝肿瘤促进剂均是以毫克剂量产生促肿瘤作用的, 因此, MCYST 是目前发现的最强的肝肿瘤促进剂^[35]。

MCYST 引起的其它生化及细胞学效应研究

MCYST 对 PP1/PP2A 的抑制可认为是其作用的分子靶位, 由于 PP1/PP2A 的被抑制而产生一系列次级效应, 可从细胞学变化, 生化成分的变化反映出来。现在已发现, MCYST 致毒后, 血糖增加, 肝糖原减少, 这是由于糖原磷酸化酶一直处于活性状态, 即磷

酸化的状态。还发现,血清丙氨酸氨基转移酶升高,肝线粒体特有的山梨醇脱氢酶释放到血液中,谷胱甘肽(GSH)耗竭,这些都是表明肝脏损伤的生化参数。将质膜碎片进行 SDS 凝胶扫描,发现 LR 致毒的动物的肌动蛋白增加,细胞角蛋白减少,表明质膜组成发生改变。

由于 GSH 耗竭是 MCYST 致毒后的一个症状,Kondo 等人推测 GSH 可能参与了 MCYST 在动物体内的代谢。GSH 在许多活细胞中大量存在,可与亲电物质迅速结合,GSH 与非生物物质的结合是体内解毒的代谢途径^[36],也可能增强了非生物物质的毒性。MCYST-YM 可使鼠肝细胞的 GSH 随时间、剂量而消耗,而预先给予(2h)GSH 可完全保护鼠免受 LR 的毒性作用^[37]。在此基础上,Kondo 等人进行了纯化学实验。因为 MCYST 分子中的甲基脱氢丙氨酸(Mdha)部分有亲电性的 α , β -不饱和羧基,能与 GSH 结合,在 MCYST 代谢中起重要作用,他们的核磁光谱分析证明了 GSH 可与 Mdha 部分的 α , β 不饱和羧基结合,而且结合后毒性大大降低,LR 与 GSH 结合后 LD₅₀由原来的 38 变为 630 μ g/kg,而 YR 的则由 91 变为 304 μ g/kg。

PP1/PP2A 的被抑制必然导致磷酸蛋白的增加,Yoshizawa 等人用鼠初级培养细胞实验对此进行了验证。实验结果不仅证明了 MCYST-LR,RR,YR 可抑制 PP1/PP2A 的活力,而且蛋白磷酸酶的抑制,蛋白磷酸化的增加呈极好的相关性,所需要的浓度也极为接近,并且 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳证明当毒素与培养细胞保温时,不同分子量的蛋白,包括 52,47,26,24,14KDa,都增加了磷酸化程度,这种磷酸蛋白增加的现象正是蛋白激酶表观活化的反应。蛋白磷酸化在维持细胞结构,协调微丝形成中起至关重要的作用,PP1/PP2A 被抑制必然从细胞结构上反应出来。组织学研究表明 MCYST 使肝细胞产生气泡,细胞膜充气,细胞间接触降低等等,这些形态学变化可能是细胞骨架成分磷酸化增加的结果。Erikson 等人的研究反映了 MCYST 抑制 PP1/PP2A 与细胞形态学变化的关系。研究中包括观察分离的肝细胞蛋白磷酸化是否增加,葡萄糖释放是否增加,细胞变化情况,以及引起以上改变的有效 MCYST 浓度,并与大田软海绵酸比较,对其结果进行归纳,如表 1 所示。

表 1 MCYST 引起肝细胞生化参数及细胞形态变化的浓度

Tab. 1 MCYST concentration that induced change of biochemical parameters and deformation of hepatocytes

浓度 Concentration	毒素 Toxin	微囊藻毒素		大田软海绵酸 Okadaic acid
		LR	RR	
PP1 IC ₅₀		6nM	3nM	160nM
PP2A IC ₅₀		2nM	1nM	4nM
胞浆中可测得蛋白磷酸化增加		200nM		
胞浆中蛋白磷酸化增加两倍		2000nM		
细胞骨架蛋白磷酸化增加		200nM		
细胞骨架蛋白磷酸化增加两倍		2000nM		
肝细胞变形 EC ₅₀		60nM	1500nM	
细胞中度变形 微丝网重组		200nM		
微丝网完全重组		2000nM		
葡萄糖输出增加 EC ₅₀		72nM	2370nM	

由表看出,引起胞浆、细胞骨架蛋白磷酸化增加,葡萄糖输出增加以及细胞的形态变化的有效剂量是类似的,诱导蛋白磷酸化明显增加的剂量亦产生微丝网的完全重组,而引起形态学变化所需的浓度比抑制 PP1/PP2A 所需的浓度要高 1—2 个数量级,形态学变化正是细胞骨架成分磷酸化增加的结果,而且 MCYST 在细胞水平上诱导的急剧的形态学变化,如细胞骨架重组,尤其是微丝组成,罕见的球状结构的形成,与强 PP1/PP2A 抑制剂 calyculin A 引起的成纤维细胞的变化极为类似。

MCYST 作用的亲器官性

天然毒素的最重要的特征是具极高的专一生物活性。几乎所有关于 MCYST 的研究都表明这类毒素具极高的细胞选择性。对于哺乳动物,MCYST 主要作用于肝脏,它引起的许多细胞学变化仅发生于肝细胞。用 MCYST 作用于人红细胞,鼠肝细胞和小鼠成纤维细胞这三种性质不同的细胞,观察细胞的形态及测定离子运输的变化以确定毒素作用是否与膜有关或具其它机制。结果发现当毒素浓度为 50nM 时,对红细胞和成纤维细胞的形态及离子运输无任何影响,但毒素浓度仅为 0.1nM 时,就使肝细胞的磷酸根及钾离子流出明显增加,而产生形态变化的浓度为 1nM。这可说明,MCYST 的细胞毒性不是与细胞膜的非专一性作用,而是与肝细胞中细胞骨架成分相互作用,离子流出的变化可能是这种作用的二级效应^[38]。由此看出 MCYST 的毒性作用表现出明显的细胞选择性。

用¹²⁵I 标记 MCYST-YM,与分离的鼠肝细胞保温。在无毒剂量(10—20nM)毒素进入细胞内,内外浓度之比可达 70,在高剂量(100nM)时,吸收停止,细胞充气,这是肝细胞对 MCYST 的反应。即使在气泡已产生时,肝细胞仍能浓缩 MCYST。加入胆汁酸或胆汁酸转运抑制剂,可抑制毒素引起的肝细胞形态学变化,说明 MCYST 进入细胞可能通过胆汁酸转运系统。由于毒素可通过富含胆汁酸载体的回肠优先被肝细胞吸收,加之它的促肿瘤作用,毫无疑问,MCYST 带给人类的主要威胁是对肝脏的严重影响。

从目前为数不多的用鱼作为材料研究 MCYST 的报道中^[39,40]也可看到,在鱼中肝脏也是 MCYST-LR 的主要靶器官,而且鲤鱼与鳟鱼的反应一致。与哺乳动物稍有不同的是,MCYST 对鱼肾亦有明显的作用,或许是因为肾小管中也有类似于哺乳动物胆汁酸运输系统的机制。关于这一点,还需要有更多的实验进行验证。

今后的研究动向

MCYST 的毒性已是肯定无疑,但它产生危害的机制,可能对人类的影响等问题尚在研究探索中,不少国家围绕这些问题正进行全面研究。如日本东京大学、名城大学、国立癌症中心研究所等单位的科学家进行合作,从毒素性质研究到毒素引起的各种效应及毒素在体内的代谢等方面展开系统的研究,美国、芬兰、澳大利亚、南非等国家的科学家也在探讨毒素作用机理方面做了大量工作。我国有何振荣、何家莞、俞家禄等人在微囊藻毒素的分离、结构测定及用生物测试法确定其毒性等方面有了一些报道^[41,42],林燕棠等人报道了贝类及赤潮生物的毒性^[43],但在毒性的定量测定及致毒机理等方面,我国仍然是空白。

在 MCYST 作用机理方面,还有许多问题值得探讨,如:(1)不用起始剂时,LR 仍可在体内产生少量病变,是否它同时具有起始剂的作用?若如此,则它的危害性更大。(2)在毒素进入肝细胞中,究竟是何种物质作为载体介入了毒素的运输?若能明确是胆汁酸载体参与了毒素运输,则可有希望将载体抑制剂作为抗毒素剂。(3)目前的研究已发现毒素在体外能与 GSH 结合,而动物致毒后 GSH 减少,这是否会破坏动物体内的解毒机制?与促肿瘤作用有无关系,也是需要进行更多研究的问题。

目前对 MCYST 的研究多以哺乳动物为材料,MCYST 对水生生物的影响的研究较少。流行病学调查表明,肝癌发病率与饮用水有关,也有研究发现人饮用正产生微囊藻水华的水体的水后有明显的肝损伤出现^[44],除了饮水外,MCYST 是否可通过食物链进入到人体内,即水环境除了是 MCYST 产生的场所,是否也可能作为 MCYST 进入人体的媒介?因此,在由大量哺乳动物实验对其毒性、作用机理作了较为明确的结论的基础上,要进一步开展以下几方面的研究:(1)、MCYST 在水中的行为;(2)、MCYST 在水生生物中的代谢、积累;(3)、MCYST 对鱼的毒性作用的分子机理。明确这些问题,不仅对于真正认识 MCYST 对人类的危害是至关重要的,而且通过对鱼和其它水生生物的作用的研究,可望将毒性作用模式结论外推到人,对于生态毒理学的研究具有重要的理论意义和应用价值。此外,还需建立灵敏可靠的方法,对饮用水源进行常规监测,保护人类免受毒素的危害。

参 考 文 献

- [1] 林金美等。一起与赤潮有关的贝类中毒事件的调查。海洋环境科学,1988,7:22—25
- [2] Baden D G et al. Neuromuscular blocking action of two brevetoxins from the Florida red tide organism *Pythodiscus brevis*. *Toxicon*, 1984,22:75—84.
- [3] Skulberg O M et al. Toxic blue-green algal blooms in Europe-A growing problem. *Ambio*, 1984,13:244—247.
- [4] Carmichchael W W et al. Algal toxins and water based diseases. *CRC Crit. Rev. Environ. Control*, 1985, 15: 275—313.
- [5] Harada K-I et al. Isolation of the toxic heptapeptide microcystins from an axenic strain of *Microcystis aeruginosa* K-139. *Toxicon*, 1991 29:479—489.
- [6] Krishnamurthy T et al. Investigations of freshwater cyanobacterial (blue-green algae) toxic peptide. I. Isolation, purification and characterization of peptides from *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena flos-aquae*. *Toxicon*, 1986,24:865—873.
- [7] Meriluoto J A O et al. Structure and toxicity of a peptide hepatotoxin from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii*. *Toxicon*, 1989, 27:1021—1034.
- [8] Sivonen K et al. Isolation and characterization of heptotoxic microcystin homologs from the filamentous freshwater cyanobacterium *Nostoc* sp. strain 152. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1990,56:2650—2657.
- [9] Bishop C T et al. Isolation and identification of the fast-death factor in *Microcystis aeruginosa* NRC-1. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 1959,37:453—471.
- [10] Botes D P et al. The structure of cyanoginosin-LA, a cyclic heptapeptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1984,1:2311—2318.
- [11] Rinehart K L et al. Nodularin, microcystin and configuration of Adda. *J. Am. Chem. Soc.*, 1988,110:8557—8558.
- [12] Kondo F et al. Formation characterization, and toxicity of the glutathione and cysteine conjugates of toxic hep-

- tapetide microcystins. *Chem Res Toxicol* 1992, 5(5) 591—596.
- [13] Harada K-I et al. Isolation and characterization of the minor components associated with microcystins LR and RR in the cyanobacterium (blue-green algae). *Toxicon*, 1990a, 28:55—64.
- [14] Harada K-I et al. Structural determination of geometrical-isomers of microcystins LR and RR from cyanobacteria by two-dimensional NMR spectroscopic techniques. *Chem. Res. Toxicol.*, 1990b, 3(5):473—481.
- [15] Kenneth M et al. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS*, 1990, 264(2):187—192.
- [16] Wicks R J et al. Environmental factors affecting the production of peptide toxins in floating scums of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in a hypertropic African. *Reservoirir. Environ. Sci. Technol.*, 1990, 24: 1413—1418.
- [17] 何振荣等. 东湖蓝藻水华毒性的研究Ⅰ季节变化及微囊藻的毒性. 水生生物学报, 1989, 13(37):201—209.
- [18] Watanabe M F et al. Heptapeptide toxin production during the batch culture of two *Microcystis* species (cyanobacteria). *J. Appl. Phycol.*, 1989, 1:161—165.
- [19] —————, Release of heptapeptide toxin (Microcystin) during the decomposition process of *Microcystis aeruginosa*. *Natural Toxins*, 1992, 1:48—53.
- [20] Hasser S B et al. Toxicity of microcystin-LR, a cyclic heptapeptide hepatotoxin from *Microcystis aeruginosa* to rats and mice. *VET. Pathol.*, 1989, 26:246—252.
- [21] Runnegar T C et al. Injury to hepatocytes induced by a peptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon*, 1987, 25:(11) 1235—1239.
- [22] Miura G A et al. Hepatotoxicity of microcystin-LR in fed and fasted rats. *Toxicon*, 1991, 29(3):337—346.
- [23] Runnegar M T C et al. The uptake of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by isolated rat hepatocytes. *Toxicon*, 1991, 29:43—51.
- [24] Cohen P et al. Protein phosphatases come of age. *The J of Biol. Chem.*, 1989, 264(36):21435—21438.
- [25] Zwiller J et al. Phosphorylation of an inositol phosphate-stimulated protein phosphatase by protein kinase C. *Biochemistry International*, 1990, 20(5):967—977.
- [26] Kikkawa U. Protein kinase C as a possible receptor protein of tumor promoting phorbol esters. *J Biol Chem* 1983, 258:11442.
- [27] Suganuma M et al. Okadaic acid, An additional non-phorbol-12-tetradecanoate-13-acetate-type tumor promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1988, 85:1768—1771.
- [28] Sassa T et al. Apparent "activation" of protein kinases by okadaic acid class tumor promoters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989, 159:939—944.
- [29] Matsushima R et al. In vitro and in vivo effects of protein phosphatase inhibitors, microcystins and rochulasin, on mouse skin and fibroblasts. *Biochem Biophys Res. Comm.* 1990, 171(2):867—874.
- [30] Nishiwaki-Matsushima R. Structure-Function relations of microcystins, liver tumor promoters, in interaction with protein phosphatase. *Jpn. J. Cancer Res.* 1991, 82:993—996.
- [31] Eriksson J E et al. Hepatocyte deformation induced by cyanobacterial toxins reflects inhibition of protein phosphatases. *Biochem. Biophysics. Res. Commun.*, 1990, 173(3):1347—1353.
- [32] Yoshizawa S et al. Inhibition of protein phosphatases by microcystin and nodularin associated with hepatotoxicity. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 1990, 116:609—614.
- [33] Honkanen R E et al. Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatase. *The J. Biol. Chem.*, 1990, 256(32):19401—19404.
- [34] Falconer I R. Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria. *Environ. Toxicol. Water Quality*, 1991, 6:177—184.
- [35] Nishiwaki-Matsushima R et al. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 1992, 118:420—424.

- [36] Ketterer B et al. The Role of glutathione in detoxification. *Environ Health Perspect*, 1983, **49**: 59—69.
- [37] Hermansky S J et al. Evaluation of potential chemoprotectants against microcystin-LR hepatotoxicity in mice. *J. Appl. Toxicol.*, 1991, **11**: 65—74.
- [38] Eriksson J E et al. Cell selective cytotoxicity of a peptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Biochem. Biophys. Acta*, 1987, **930**: 403—410.
- [39] Rabergh C M I et al. Histopathological effects of microcystin-LR, a cyclic peptide toxin from the cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis aeruginosa*, on common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquatic Toxicol.*, 1991, **20**: 131—146.
- [40] Phillips M J et al. The toxicity of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to trout *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Dis.*, 1985, **8**: 339—344.
- [41] 何家莞等. 东湖铜绿微囊藻毒素的分离与鉴定. 海洋与湖沼, 1988, **19**(5): 424—430.
- [42] 俞家禄等. 东湖蓝藻水华毒性的研究Ⅰ. 淡水蓝藻水华毒性的检测. 水生生物学报, 1987, **11**(3): 212—218.
- [43] 林燕棠等. 几种贝类及赤潮生物的毒性测定. 聊南大学学报(赤潮研究专刊)1989, **83**—89.
- [44] Falconer I R et al. Evidence of liver damage by toxin from a bloom of the blue-green alga, *Microcystis aeruginosa*. *Med. J. Austral.*, 1983, **1**: 511—514.