

综 述

微囊藻毒素的产生、检测和毒理学研究*

李效宇 宋立荣 刘永定

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

THE PRODUCTION, DETECTION AND TOXICOLOGY OF MICROCYSTINS

Li Xiaoyu, Song Lirong and Liu Yongding

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

关键词 微囊藻毒素, 毒素产生, 检测, 毒理学

Key words Microcystins, Production of microcystins, Detection, Toxicology.

随着内陆水体富营养化的加剧而引起有害藻类水华(HAB, harmful algal bloom)的频繁发生已成为国内外普遍关注的环境问题^[1], 其中微囊藻(*Microcystis*)水华是淡水水体中危害最严重的一类, 由于这类水华发生普遍, 持续时间长, 而且多数产毒, 危害性更大, 因而倍受人们的关注^[2-5]. 微囊藻毒素(Microcystins)是一类具生物活性的单环七肽^[6], 这类毒素主要由淡水藻类铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)产生, 此外其他种类的微囊藻, 如绿色微囊藻(*M. viridis*)、惠氏微囊藻(*M. wesenbergii*)以及鱼腥藻(*Anabaena*)、念珠藻(*Nostoc*)、颤藻(*Oscillatoria*)的一些种或株系也能产生这类毒素. 微囊藻毒素的一般结构为环(D-丙氨酸-L-X-赤- β -甲基-D-异天冬氨酸-L-Z-Adda-D-异谷氨酸-N-甲基脱氢丙氨酸), 其中 Adda(3-氨基-9-甲氧基-2, 6, 8-三甲基-10-苯基-4, 6-二烯酸)是微囊藻毒素生物活性表达所必须的. 目前所检测到的微囊藻毒素异构体已超过 50 多种^[7]. 由微囊藻毒素所造成的野生动物、家畜、家禽等中毒、死亡的事件已有许多报道^[8, 9], 同时因饮用水中含有微囊藻毒素所引发的人类肝损伤及肝癌高发率也有一些报道. 最近在巴西发生的一起严重的血透析事件, 就是用了来自蓝藻污染的水, 患有肝炎的 126 个病人中, 至少 43 个死亡. 虽然浮游动物和鱼类对微囊藻毒素有较大的耐受性, 但毒素常可在其体内富集和存留, 并达到相当高的浓度, 通过生态系统、食物链而对人类所造成的潜在威胁更不容忽视. 因此, 搞清楚微囊藻毒素的产生机理, 毒性及其

* 国家自然科学基金项目 39730380 资助, 中国科学院重点项目资助 KZ952-S1-120
1999-08-02 收到; 1999-09-09 修回

毒理, 毒素的检测、降解以及如何控制产毒水华的发生是非常必要的。

1 微囊藻毒素的产生

微囊藻毒素是细胞内毒素, 它在细胞内合成, 细胞破裂后释放出来并表现出毒性。由于它很小的体积(分子量 1000 左右)、环状结构及其氨基酸的特殊结构, 一般认为它不在核糖体合成, 而是由肽合成酶复合体合成的生物活性小肽, 这类似于在一些杆菌和真菌中小肽的合成。这些小肽大多是抗生素、免疫抑制物以及一些对动物和植物有毒的物质^[10-12]。关于微囊藻毒素产生的机理有很多假设, 但到目前为止尚无令人满意的结果。有两种可以考虑的可能性, 一是遗传差异即微囊藻有毒株和无毒株的遗传结构不同, 另一种是环境因子影响或改变毒性^[13]。

1.1 环境因子对微囊藻毒素产生的影响

环境因子的作用大多是在实验室内人工培养条件下进行的, 毒素的产生受很多环境因子的制约, 其中光照可能起着非常重要的作用。早期研究工作多集中在光照强弱和产毒的关系^[14, 15], 近期研究结果^[16]表明, 微囊藻细胞的能量状态即腺苷酸能荷(ATP + 1/2 ADP: ATP + ADP + AMP)控制着毒素的产生, 因此任何影响腺苷酸能荷的因素都会调节毒素的产生, 其中光照, 营养(如磷, 铁)的作用最大, 能量和毒素产生的相互关系可表示为每合成 1mol 的毒素所需要的 nmol 的 ATP。Utkilen^[17]也证实了 ATP 和毒素含量的相互关系, 认为光能是毒素产生的一个重要制约因子, 甚至是唯一的因子, 因为他发现温度在高光强下对毒素的产生几乎没有影响, 而在低光强下温度才会影响毒素的产生。

除了光照, 温度也影响毒素的产生, 一般认为低温(18-20℃)时, 微囊藻毒性强, 而这种温度常不是微囊藻最适生长所适合的。营养盐的浓度对毒素的产生也有很大的影响, 但不同种类的营养盐作用不一。氮和碳影响不明显, 磷的作用较明显, 在微量因素中, Al, Cd, Cr, Cu, Mn, Ni 和 Sn 对毒素产生无影响, 而 Fe, Zn 影响极明显, 在 BG11 培养基中, 降低 Fe 和 Zn 的浓度都会明显地提高毒素的产生^[18]。

关于环境因子对毒素产生的作用, 澳大利亚 Orr^[19]等人在铜绿微囊藻的批量培养中发现, 微囊藻毒素的产生率随细胞分裂率的下降而降低, 二者呈很好的相关关系。当细胞处于不断分裂状态时, 微囊藻毒素库(总的微囊藻毒素含量)的实际体积在增加, 到静止期或死亡期, 维持恒定或略下降, 而此时细胞分裂速度几乎等于零。这一结果表明, 微囊藻细胞分裂速度和微囊藻毒素的产生是紧密偶联的。环境因子通过作用于细胞分裂速度而控制毒素产生, 而不是直接作用于毒素产生的代谢途径。因此, 细胞分裂速度和毒素产生率之间的线性相关关系是微囊藻毒素产生的普遍机制, 这一关系能较好地解释环境因子对毒素产生的作用。

1.2 遗传结构的不同

持毒素遗传决定论者认为, 微囊藻有毒株(Toxic strains)和无毒株(Nontoxic strains)的毒性是由遗传决定的, 并对微囊藻的遗传结构进行研究, 如微囊藻属不同种及株系的 16SrRNA 及其基因序列测定, 16SrRNA 和 23SrRNA 基因之间的间隔序列测定等^[20], 试图找出两者的差异。研究结果表明^[21-23], 微囊藻毒素的合成是由毒素肽合成酶基因多基因控制的, 并由肽合成酶复合体合成(非核糖体合成的多肽)。肽合成酶及其编码基因在多

种微生物(如某些藻类、细菌和真菌)中存在,并控制多种生物活性小肽的合成.肽合成酶基因都拥有一个模数(Modular)结构,而每一个肽合成酶模数都含有具特异功能的结构域,这些功能区负责多肽合成时的识别、氨酰-腺苷酸化、氨基酸底物的硫酯化以及正在合成肽的伸长,微囊藻毒素肽的合成至少需要七个肽合成酶模数.通过对 *M. aeruginosa* PCC7806 的 DNA 顺序分析研究发现,这种产毒的微囊藻含有具同源性的肽合成酶基因保守序列,其中至少含有两个多肽合成酶基因,而微囊藻无毒株不具有这些基因.应用基因转化和插入失活的方法使一个肽合成酶基因失活所获得的突变细胞不再产生微囊藻毒素,但仍有产生其他小肽的能力,而且已经从 PCC7806 野生型和突变细胞内纯化出肽合成酶,突变细胞缺失了三种对微囊藻毒素复合体形成所需要的蛋白质.这一结果表明,微囊藻有毒株和无毒株的遗传差异在于是否存在一种或几种编码毒素合成酶的基因.

2 微囊藻毒素的检测

微囊藻毒素的检测大致可以分为生物测试法、化学分析和生物化学方法^[24].

生物测试方法通常用小白鼠毒性试验,可用于定性判定微囊藻是否具有毒性,但不能用于毒素的种类和定量测定,而且专一性和灵敏度差,并需要较多的样品量.

化学分析方法主要采用色谱分析方法,常用的有薄层色谱(TLC)、气相色谱(GC)、高效液相色谱(HPLC)和液相色谱/质谱分析(LC/MS)^[25-27].气相色谱只能测定微囊藻毒素的总量,相比之下薄层色谱则略具优势,它易于操作,不需要特殊设备,也不很耗时,可达纳克级的检测水平.普通和反相高压薄层色谱也是肽毒素的提取、纯化的简便快速方法.高效液相色谱是应用最为广泛一种检测方法,它可以相当精确地定性、定量检测微囊藻毒素,也可用于微囊藻毒素的分离、纯化,通常可达纳克级的检测水平,改进的方法甚至可达匹克级.液相色谱/质谱分析方法是一种较快速、精确的毒素检测方法,检测可达纳克级,而且发展的质谱分析方法——快速原子轰击质谱分析(FABMS)和液相次级离子质谱(LSIMS)可用于毒素分子量的确定.Harada^[28]最近所建立的电离子化气相色谱/质谱分析方法(EIGS/MS)可以在半小时内完成对毒素的检测,达纳克级检测水平,而 Marcel Ethard^[29]等所创建的 MALDI-TOF MS 可以在数分钟内检测出微克级的毒素,并能同时检测出蓝藻所产生的其它小肽,利用这种技术可在数分钟内确定毒素肽的结构特征.

生物化学方法主要有酶联免疫测定(ELISA)和蛋白磷酸酶抑制测定方法^[30].ELISA 方法以前多用于对总毒素的测定,虽灵敏度高,但选择性差,目前发展起来的 ELISA 方法,专一性强,灵敏度高,通常能检测到 1ng/ml,有些能达到 pg/ml,已广泛用于实验室培养、自然水体及各种样品的毒素测定,而且商业用 ELISA 试剂盒也投放市场^[31].蛋白磷酸酶抑制法检测毒素是利用微囊藻毒素对蛋白磷酸酶(PP1, PP2A)活性专一性的抑制,依据活性抑制和毒素含量相关关系来测定毒素方法.常用的有同位素标记法和微量比色法,目前常与色谱(如 HPLC)结合使用,该法灵敏度高,一般可达到纳克级,极限匹克级.

3 微囊藻毒素的生物学效应

3.1 微囊藻的毒性

自从 1878 年 Francis 首次发现泡沫节球藻(*Nodularia spumigena*)水华能够引起家

畜、禽类中毒、死亡以来,有关藻类水华引起的野生动物、鱼类、家畜、家禽及宠物中毒、死亡的报道很多,其中以微囊藻水华的危害最严重、广泛.动物通过直接接触或饮用含有微囊藻毒素的水而中毒,中毒症状主要有昏迷、肌肉痉挛、呼吸急促、腹泻,甚至在数小时以至数天内死亡.研究证明,中毒死亡主要是由于肝损伤,微囊藻毒素造成肝内出血甚至肝坏死.微囊藻毒素对动物的毒害程度主要与水华密度、水体毒素含量有关,也与动物种类和大小有关.单胃动物没有反刍动物和鸟类敏感^[32].

微囊藻毒素同样也危害人类健康.人们直接接触含有毒素的水华,如在湖泊、河流、水库中进行游泳等娱乐活动,会引起皮肤、眼睛过敏,发烧,疲劳以及急性肠胃炎,如果经常暴露于含有毒素的水体,会引发皮肤癌、肝炎及肝癌.有研究证明,饮用含有微囊藻毒素的水,人群肝癌的发病率明显高于饮用深井水.由于微囊藻毒素专一性地作用于肝脏,是极强的促肿瘤剂,其对人类健康的危害正日益受到全世界关注.目前,许多国家已建立了饮用水微囊藻毒素限制标准,其最高允许含量为 $1\mu\text{g/L}$ ^[33].

3.2 毒理学

已有的研究结果表明,微囊藻毒素作用的靶器官为肝脏^[34],通过对鼠或鱼腹腔注射毒素或口服给药,迅速引起实验动物的急性中毒,解剖观察发现肝脏肿大、充血以至坏死;组织细胞学研究表明,毒素引起线粒体肿胀,窦状隙结构丧失,桥粒张力丝丧失,细胞间接接触降低,微丝网重组,肝细胞变形.尽管微囊藻毒素专一性作用于肝细胞,但毒素通过简单扩散的跨膜渗透能力却很低,它不象环孢素、短杆菌素等那些亲水酯小环肽那样易于穿过细胞膜,而必须有中间载体转运.Eriksson 等认为肝细胞膜上的胆汁酸转运系统是毒素进入细胞的中间载体^[35].微囊藻毒素进入肝细胞后,能强烈地抑制蛋白磷酸酶的活性,但它专一性地作用于蛋白磷酸酶 1(PP1)和蛋白磷酸酶 2A(PP2A),而对其它三种蛋白磷酸酶的活性无影响.由于对 PP1 和 PP2A 活性的抑制,相应地增加了蛋白激酶的活性,导致细胞内多种蛋白质的过磷酸化,打破了细胞内蛋白磷酸化/脱磷酸化的平衡,并通过细胞信号系统进一步放大这种生化效应,改变了多种酶的活性,造成了细胞内一系列的生理生化反应的紊乱,进而导致了肝细胞的损伤.如由于细胞骨架蛋白的过磷酸化,诱导了细胞中间纤维网络的重组,引起了细胞骨架系统的破坏,从而造成了肝细胞变形^[36].值得注意的是,微囊藻毒素的促肿瘤作用也是通过这种方式实现的,这种促肿瘤作用和大田海绵酸(Okadaic acid)的促肿瘤作用原理相似^[37].

微囊藻毒素还能激活肝细胞中负责花生四烯酸代谢的环加氧酶,从而促进花生四烯酸代谢物的合成,其机理目前尚不清楚.近来认为微囊藻毒素能和含有巯醇基的谷胱甘肽(GSH)作用,推测毒素可能抑制乙酰辅酶 A 转移酶和乙酰辅酶 A 合成酶活性,从而阻止花生四烯酸进入酯库,由此导致了前列腺素(PG)合成的增加.毒素以这种方式改变磷脂的再循环,由于磷脂酰胆碱和其它酯类是花生四烯酸合成的主要来源,尤其是刺激了磷脂酰肌醇的降解以及花生四烯酸的释放,在细胞生理生化代谢中有重要影响.因为它们在细胞信号系统中作为此级信使起作用并刺激钙的代谢,由此造成一系列的代谢紊乱^[38].

微囊藻毒素还能作用于肝巨噬细胞,诱导白细胞介素 1(IL-1)的产生,IL-1 再诱导引起急性炎症的物质,如前列腺素,血栓素及肿瘤坏死因子(TNF- α),这些物质导致了肝损伤和坏死,这说明巨噬细胞合成和释放出发炎的物质是对微囊藻毒素休克的一种响

应^[39].

总之,微囊藻毒素能作用于肝脏的两种细胞,即肝细胞和肝巨噬细胞,在肝细胞中它能抑制蛋白磷酸酶的活性,而激活蛋白激酶和环加氧酶;在巨噬细胞中,毒素能诱导肿瘤坏死因子(TNF- α)和白细胞介素 1(IL-1),这些细胞素能诱导产生血小板激活因子(PAF)并激活环加氧酶,环加氧酶诱导产生血栓素和前列腺素,引起肝炎症、肝损伤甚至肝坏死(图 1).

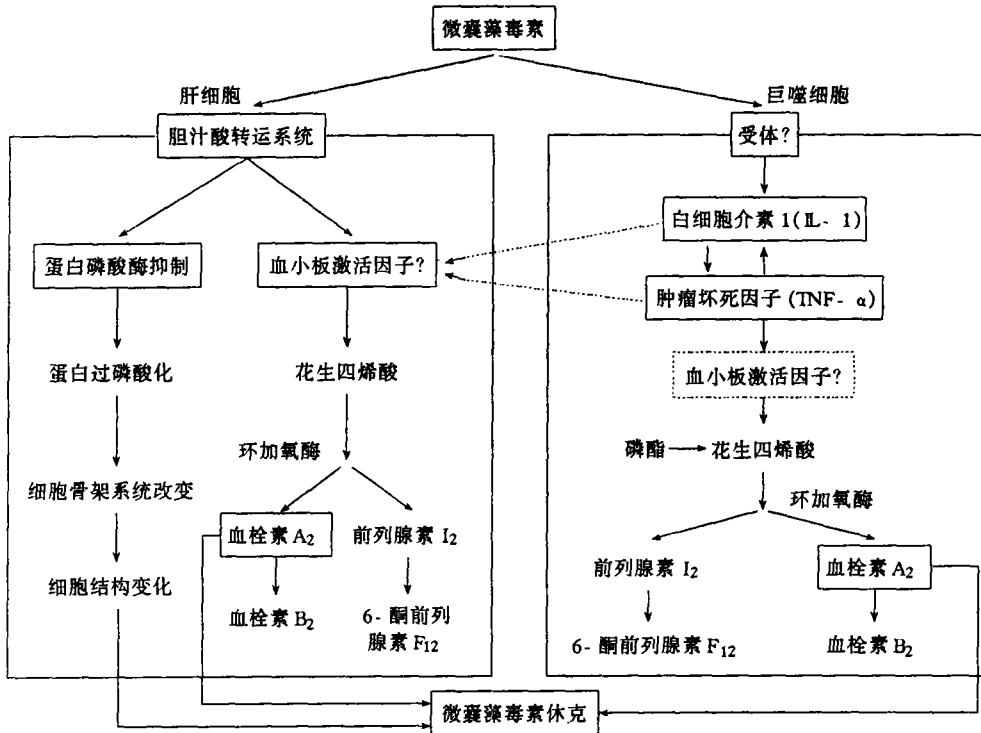


图 1 微囊藻毒素的毒性作用机理

Fig. 1 Toxic mechanism of microcystins

4 研究展望

虽然微囊藻毒素的研究历史已近百年,而且也取得了很多有价值的研究成果,但在微囊藻毒素的产生机理、毒素的功能以及毒理学等方面尚有很多值得深入探讨的问题.关于微囊藻毒素产生机理研究是目前热点,究竟微囊藻毒素产生是受遗传控制还是环境因子左右,研究者各持己见,尚无定论.因为有很多现象是这些假设无法解释的,如在自然水体中,一些微囊藻水华在早期阶段无毒,而在大量发生时即产生毒性;同一种微囊藻的不同株系甚至不同的克隆毒性也不同;有些种类在自然水体中有毒,实验室培养后即丧失毒性,而有一些却一直保持毒性,长期培养无任何变化等.尽管毒素肽合成酶已经纯化,毒素肽合成酶基因的结构、功能等也有较详尽的研究,但微囊藻毒素的生化合成途径却仍不清楚.美国、德国、澳大利亚等国家的科学家正在从事这方面的研究工作.

微囊藻毒素究竟有何功能也是当今尚未回答的问题. 一些研究者认为, 微囊藻毒素并不是次级代谢产物, 它可能在有毒微囊藻的细胞生命活动中有很多功能. 如和金属离子 Fe, Zn 的结合及 Ca^{2+} , Mg^{2+} 的跨膜转运有关; 也有人认为毒素是环境压力(如浮游动物的摄食压力)所诱导产生的, 有保护作用. 还有一些研究者报道, 毒素和藻类能量、氮、磷代谢及细胞液泡化有关等, 其中许多假设缺乏足够的实验证据, 因此微囊藻毒素的真正功能还有待于进一步的研究.

在微囊藻毒素毒理学研究方面, 目前主要集中于微囊藻毒素的肝受体、毒素的转运原理、毒素作用的分子机理尤其是促肿瘤的分子机制等方面的研究. 同时微囊藻毒素在水体中的代谢行为和通过水体生态系统食物链可能对人类健康所造成的影响等也倍受科学家关注和重视. 另外, 人们也正致力于微囊藻毒素的降解、防护和治疗等方面的研究工作, 以期减少以至消除微囊藻毒素对生态系统和人类的危害.

参 考 文 献

- [1] Hallegraff G M. A review of harmful algal bloom and their apparent global increase. *Phycologia*, 1993, 32(2):79
- [2] Cormichael W W. Toxic Microcystis and the environment. in : Toxic Microcystis. Watanabe M F, et al. Boca Raton: CRC Press, 1996, 2 - 4
- [3] 何家菀等. 东湖铜绿微囊藻毒素的分离和鉴定. 海洋与湖沼, 1988, 19(5):424 - 430
- [4] 李仁辉等. 中国新记录——绿色微囊藻及其毒性的初步研究. 水生生物学报, 1993, 17(3):282 - 284
- [5] 何家菀等. 我国产毒微囊藻的新发现——惠氏微囊藻及其毒性的初步研究. 水生生物学报, 1996, 20(2):192 - 194
- [6] Carmichael W W. The toxins of cyanobacteria. *Sci. Am*, 1994, 270:64 - 72
- [7] Rinehart K L, Namiloshi M. and Choi B W. Structure and biosynthesis of toxins from blue - green algae(cyanobacteria). *J. Appl. Phycol.* 1994, 6: 159
- [8] Philips M J, et al. The toxicity of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to rainbow trout. *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Dis.* 1985, 8: 339.
- [9] Skulberg O M, et al. Toxic blue-green algal blooms in Europe? A growing problem. *Ambio*, 1984, 13:244 - 247
- [10] Elke Dittmann, et al. Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Molecular Microbiology*, 1997, 779 - 787
- [11] Stachelhaus T, Marahiel M A. Modular structure of genes encoding multifunctional peptide synthetases required for non-ribosomal peptide synthesis. *FEMS MicrobiolLett*, 1995, 125:3 - 14
- [12] Kleikauf H and Von Dohren H. A non-ribosomal system of peptide biosynthesis. *Eur J Biochem*, 1996, 236: 335 - 351
- [13] Watanabe M F. Production of Microcystins. in : Toxic Microcystis. Watanabe M F, et al. Boca Raton: CRC press, 1996, 40 - 49
- [14] Watanabe M F and Oishi S. Effects of environmental factors on toxicity of a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions. *Appl. Environ. Microbiol*, 1985, 49:1342
- [15] Utkilen H and Gjørlme N. Toxin production by *Microcystis aeruginosa* as a function of light in continuous cultures and its ecological significance. *Appl. Environ. Microbiol*, 1992, 58:1321
- [16] Bickel H Lyck S and Utkilen H. Does the energetic stage of *Microcystis* cells affect the microcystin content? Compilation of abstracts, 4th International Conference on Toxic Cyanobacteria. 1998, 39
- [17] Utkilen H, Gjørlme N. Emerges the dominating controlling factor for microcystin production in *Microcystis aeruginosa*

- nosa? Compilation of abstracts, 4th International Conference on Toxic Cyanobacteria. 1998, 63
- [18] Lukae M and Aegerter R. Influence of trace metals on growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon*, 1993, 31: 2293 - 305
- [19] Orr P T and Jones G J. Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures. *Limnol. Oceanogr.*, 1998, 43(7):1604 - 1614
- [20] 陈月琴,何家苑,庄丽等. 两种淡水微囊藻 rDNA16s - 23s 基因间隔区的序列测定和分析. 水生生物学报, 1999, 23(1):41 - 46
- [21] Meißner K, Dittmann E, Borner T. Toxic and non - toxic strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* contain sequences homologous to peptide synthetase genes. *FEMS Microbiology Letters*. 1996, 135: 295 - 303
- [22] Dittmann E, Meißner K and Borner T. Conserved sequences of peptide synthetase genes in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Phycologia*, 1996, (supplement), 35: 62 - 67
- [23] Borner T. Microcystins synthetase: gene and enzyme. 4th International Conference on Toxic Cyanobacteria. 1998, 58
- [24] Harada K - I. Chemistry and detection of Microcystins. In: Toxic Microcystis. Watanabe M F, et al. Boca Raton: CRC Press, 1996, 117
- [25] Poon G K, et al. Liquid chromatography-electrospray ionization - mass spectrometry of cyanobacterial toxins. *J. Chromatogr.*, 1993, 628: 215
- [26] Harada K - I, et al. Improved method for purification of toxic peptide produced by cyanobacteria. *Toxicon*, 1988a, 26: 43
- [27] Sano T, et al. A method for micro - detection of microcystin content in waterloom of cyanobacteria (blue - green algae). *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 1992, 49: 163
- [28] Harada K - I, et al. Mass spectrometric screening method for microcystins in cyanobacteria. *Toxicon*, 1996, 34: 701 - 710
- [29] Erhard M. Detection in minutes and structure determination in hours of cyanobacterial peptides using MALDI TOF Mass Spectrometry. 4th International Conference on Toxic Cyanobacteria. 1998, 28
- [30] Dawson R M. The toxicology of Microcystins. *Toxicon*. 1998, 36(7):953 - 962
- [31] Beattie K. Applications and performance assessment of a commercially - available ELISA kit for microcystins. 4th International Conference on Toxic Cyanobacteria. 1998, 18
- [32] Carmichael W W. Toxic Microcystic and the environment. In: Toxic Microcystis. Watanabe M F, et al. Boca Raton: CRC Press, 1996, 6 - 7
- [33] Bell S G and Codd G A. Cyanobacterial toxins and human health. *Rev Med, Microbiol.* 1994, 5:256 - 264
- [34] Miura G A, et al. Hepatotoxicity of microcystin - LR in fed and fasted rates. *Toxicon*. 1991, 29(3): 337 - 346
- [35] Eriksson J E, et al. Hepatocellular uptake of 3H - dihydromicrocystin - LR a cyclic peptide toxin. *Biochem. Biophys. Acta*. 1990, 1025:60
- [36] Macias - Silva M and Gareia - Sainz J A. Inhibition of hormone - stimulation inositol phosphate production and disruption of cytoskeletal structure. Effects of okadaic acid, microcystin, chlorpromazine, W7 and nystatin. *Toxicon*, 1994, 32: 105 - 112
- [37] 徐立红,张甬元. 微囊藻毒素分子致毒机理研究进展. 水生生物学报, 1993, 17(4):365 - 374
- [38] Naseem S M, Mereish K A, Solow R et al. Microcystin-induced activation of prostoglandin synthesis and phospholipid metabolism in rat hepatocytes. *Toxic. In Vitro*. 1991, 5:341
- [39] Nakano Y, Shirai M, Mori N and Nakano M. Neutralization of microcystin shock in mice by tumor necrosis factor alpha antiserum. *Appl. Environ. Microbiol.* 1991, 57, 327