

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.16331

麻痹性贝类毒素在栉孔扇贝体内的代谢轮廓

邴晓菲^{1,2}, 吴海燕¹, 王群³, 李清云¹, 郭萌萌¹, 国佼¹, 翟毓秀¹, 谭志军¹

1. 农业部水产品质量安全检测与评价重点实验室, 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306;

3. 中国水产科学研究院, 北京 100141

摘要: 将栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)直接暴露于产毒藻, 通过比较各组织器官中毒素的蓄积及代谢转化特征, 研究麻痹性贝类毒素(Paralytic Shellfish Toxins, PSTs)在栉孔扇贝体内危害形成的过程。结果显示, 分布于中国的一株塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*, AT5-3 株), 其生长及产毒性状稳定, 产毒能力强, 主要成分为 Gonyautoxins-1&-4(GTX1&4), 单细胞产毒能力为 7.95 fmol/cell; 栉孔扇贝对该产毒藻具有较强摄食能力及 PSTs 蓄积能力, 总体蓄积效率达到 84.4%, 最高蓄积浓度为 1903 $\mu\text{g STX eq./kg}$, 不同组织蓄积能力由高到低依次为内脏团、性腺、外套膜、闭壳肌; 内脏团对 PSTs 的代谢能力也最强, 是该毒素在栉孔扇贝体内蓄积代谢的靶器官; 此外, 栉孔扇贝对 PSTs 表现出较强的生物转化能力, 主要转化途径为: N-磺酰胺甲酰基类毒素(N-Sulfocarbamoylgonyautoxin-2, C1)→膝沟藻毒素(Gonyautoxins-2, GTX2)/脱氨甲酰基类毒素(Decarbamoylgonyautoxins-2, dcGTX2), N-磺酰胺甲酰基类毒素(N-Sulfocarbamoylgonyautoxin-3, C2)→膝沟藻毒素(Gonyautoxins-3, GTX3)。本研究, 栉孔扇贝对 PSTs 总体呈现出迅速蓄积和缓慢代谢的特点, 同时, GTX1&4 和 NEO 等高毒成分所占比例较高, 造成扇贝中 PSTs 毒性和风险性均显著升高。本研究有助于科学评估 PSTs 危害的形成机制, 为系统监控我国 PSTs 风险性提供科学支撑。

关键词: 麻痹性贝类毒素; 栉孔扇贝; 塔玛亚历山大藻; 蓄积; 代谢; 靶器官

中图分类号: X171

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)03-0623-10

麻痹性贝类毒素(Paralytic Shellfish Toxins, PSTs)是世界上分布最广、危害最大的一类海洋生物毒素, 目前共发现 57 种同系物^[1]。海洋环境中, PSTs 主要由亚历山大藻(*Alexandrium*)、裸甲藻(*Gymnodinium*)以及盾甲藻(*Pyrodinium*)等单细胞甲藻产生^[2]。PSTs 不仅直接影响生物活性, 威胁海洋生态系统稳定, 还通过食物链传递到贝类、鱼类等生物体内, 已在全世界范围内对消费者健康和带来严重影响。研究发现, PSTs 主要通过选择性堵塞钠/钾离子通道, 导致中毒者出现不适症状, 轻则表现为口舌麻木、轻微头疼, 重则四肢麻痹、呼吸困难, 甚至窒息死亡^[3]。据统计, 世

界范围内每年约有 2000 起因 PSTs 引起的中毒事件, 死亡率约 15%, 多数是由于食用染毒贝类而导致的死亡^[2,4]。作为一个贝类养殖大国, 赤潮高发致使我国贝类产业深受贝类毒素所害^[5-6], 不仅直接造成欧盟等国际市场对我国贝类产品的关闭, 还多次导致我国消费者出现中毒事件。2016 年 5 月在秦皇岛发生的因食用贻贝致 PSTs 群体性中毒事件, 不仅严重危及到社会稳定, 同时也对我国刚刚通过欧盟审核的贝类产业重新敲响了警钟, 因此应务必加以重视。

海产贝类是导致 PSTs 危及消费者健康安全的最主要水产生物。由于贝类对 PSTs 敏感性较低,

收稿日期: 2016-11-04; 修订日期: 2016-12-20.

基金项目: 山东省重点研发计划项目(2016GSF120018); 中央级公益性科研院所基本科研业务费资助项目(2016HY-ZD1101, 20603022015017-1).

作者简介: 邴晓菲(1990-), 女, 硕士研究生, 从事贝类毒素研究. E-mail: qingdaobxf229@163.com

通信作者: 谭志军, 副研究员, 主要从事贝类毒素安全检测及评价研究. E-mail: tanzj@ysfri.ac.cn

加上其滤食性特点,因此贝类极易蓄积 PSTs。PSTs 进入贝类体内后,经过分布、转化及代谢等过程,可一定程度上降低贝类中 PSTs 的含量或毒性,以达到保护贝类自身的目的^[7]。然而,这一过程中,在贝类的转化作用下可生成新的 PSTs 组分(代谢产物),对消费者健康带来新的威胁。贝类中 PSTs 组分的种类、含量及分布的不同,可能导致其总的毒性具有较大差别^[8]。因此,国际社会利用毒性当量因子(Toxicity Equivalency Factors, TEF)来比较不同 PSTs 组分的差异性,并通过换算以评估贝类中 PSTs 残留的风险性,欧盟、美国、加拿大等多个国家和地区均制定了 800 μg STX eq./kg^[9]的残留限量。因此,弄清贝类对 PSTs 的蓄积能力、分布规律及代谢消除的过程,了解产物生成及毒性变化,是正确解析贝类中 PSTs 危害形成的前提和基础,也是国际社会研究的热点和重点。

研究发现,贝类中 PSTs 毒性危害大小与双壳贝种类相关。一般认为,贻贝对 PSTs 蓄积能力较其他贝类强^[10],我国秦皇岛发生的中毒事件就由贻贝所导致;但其他贝类,如扇贝也对消费者产生较大消费风险。另外,产毒藻中 PSTs 种类及其在贝类中的代谢轮廓对于贝类中 PSTs 风险大小也具有决定性作用^[11],低毒性 PSTs 成分可能经过生物转化而成为高毒成分。而目前,我国针对 PSTs 在双壳贝类中的代谢研究多集中于其基本代谢规律研究^[12-13],较少进行 PSTs 危害形成的过程研究,尤其是代谢产物生成及转化过程的研究。因此,本研究选择我国重要经济贝类之一——栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)作为研究对象,将其暴露于分离自我国近海的一株塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)AT5-3 株,研究栉孔扇贝对其所产 PSTs 的蓄积代谢能力,重点分析 PSTs 在贝类中的生物转化及风险形成,评估了栉孔扇贝中 PSTs 蓄积对消费者健康带来的潜在风险,对于 PSTs 限量标准评估及风险监控具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 化学试剂 乙腈(色谱纯),购自 Sigma 公

司;甲酸(色谱纯),购自 CNW 公司;冰乙酸(优级纯),氨水(优级纯),购自国药集团化学试剂有限公司;甲酸铵(质谱纯),购自 Fluka 公司。

麻痹性贝毒标准品,包含石房蛤毒素(Saxitoxin, STX)、新石房蛤毒素(Neosaxitoxin, NEO)、脱氢甲酰基类毒素(Decarbamoylsaxitoxin, dcSTX; Decarbaoylneosaxitoxin, dcNEO; Decarbamoylgonyautoxins-2&-3, dcGTX2&3; Gonyautoxin-5, GTX5; N-Sulfocarbamoylgonyautoxin-2&-3, C1&2)、膝沟藻毒素(Gonyautxins-2&-3, GTX2&3; Gonyautoxins-1&-4 (GTX1&4),购自于加拿大海洋生物研究所。

1.1.2 仪器 智能光照培养箱(宁波海曙赛福实验仪器厂);超低温保存箱(-80°C , 海尔);超声细胞粉碎机(JY92-II N, 宁波新芝生物科技股份有限公司);台式高速离心机(Neofuge 1600, 上海力申科学仪器有限公司);漩涡混合仪(TALBOYS);LC-20A 液相系统(日本 Shimadzu 公司);QTRAPTM 5500 三重四级杆复合线性离子阱质谱仪(美国 AB Sciex 公司),配有电喷雾电离源(ESI 源)。

1.1.3 产毒藻、饵料藻及扇贝 塔玛亚历山大藻 AT5-3 株由中国科学院海洋研究所提供,分离自我国南海海域。实验室以 L1 Medium 培养液单种培养,温度(20 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,光照 54 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$,光暗比 12 h : 12 h。选用指数生长期(密度为 40000~42000 cells/mL)的藻液用于暴露实验。饵料藻选用三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum bohlin*),同样条件下以 L1 Medium 培养液培养。

栉孔扇贝取产自青岛市胶南灵山湾养殖海域的 2 龄扇贝,实验室暂养 2 d 后用于实验。暂养期间不投喂饵料藻,水温控制在(16 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,24 h 不间断充气。

1.2 实验方法

1.2.1 塔玛亚历山大藻 AT5-3 株生长及产毒能力的评估 为使 AT5-3 快速达到指数期,将 AT5-3 单种培养在 500 mL 三角烧瓶中,初始接种密度为(7500 ± 232) cells/mL。本实验共培养 25 瓶 AT5-3 产毒藻,其中 5 瓶用于计数以记录产毒藻生长情况,每天上午 10 点随机抽取 2 瓶,摇匀后取 5 mL 藻液,以鲁格氏液固定后,显微镜下用显微计数

框进行计数; 20 瓶用于 PSTs 产毒的分析测定, 每天随机取 2 瓶, 量取 100 mL 培养液抽滤到孔径为 0.22 μm 的玻璃纤维滤膜, -18°C 保存以待分析。

AT5-3 中 PSTs 提取参考 Zou^[14]的提取方法并改进: 将含有 6×10^5 cells 的藻液经孔径为 0.22 μm 微膜过滤, 然后用 5 mL 0.01 mol/L 乙酸冲洗微膜, 循环超声破碎 15 min, 5000 r/min 离心 10 min, 取 200 μL 上清液于进样小瓶中, 加入 600 μL 乙腈稀释混匀, 以测定 PSTs。

1.2.2 栉孔扇贝暴露实验

(1) 暴露实验 根据预实验结果, 暴露实验共持续 20 d, 其中蓄积阶段为 4 d, 代谢阶段为 16 d。随机选取 120 只活性良好且无 PSTs 污染的栉孔扇贝, 置于 6 个盛有 40 L 海水的塑料容器中进行暴露实验, 每个容器放 20 只扇贝。实验开始后, 分别在 0.5 d、1 d、2 d、4 d (最后 1 次投喂 AT5-3)、5 d、6 d、8 d、12 d、20 d 进行采样。其中, 蓄积阶段不投喂饵料藻, 仅每天 2 次定时投喂指数期 AT5-3, 并确保有毒藻投喂量为 8×10^6 cells/(只·d)。代谢阶段投喂三角褐指藻(干重)40 mg/(只·d)(按生物量计算)采样时, 随机取 5 只栉孔扇贝, 清洗后现场分离其内脏团、性腺、外套膜和闭壳肌, 均置于 -80°C 冷冻保存。

(2) 清滤率和摄食率的测定 暴露实验过程中, 同时测定栉孔扇贝对产毒藻的清滤率和摄食率。具体方法为: 在每次投喂产毒藻后每隔 2 h 取 1 次水样, 显微镜下观察剩余产毒藻密度以及是否有假粪存在。计算公式如下^[15]:

清滤率 CR (clearance rate) = $V(\ln C_0 - \ln C_t)/T$

摄食率 IR (ingestion rate) = $V(C_0 - C_t)/T$

式中, V 为实验海水体积, C_0 为实验开始时的饵料密度, C_t 为 T 时间时的饵料密度。

1.2.3 毒素分析

(1) 样品处理 参考 Boundy 等^[16]的前处理方法并改进: 称取 5 g 均质样品于 50 mL 离心管中, 加入 5 mL 1% 乙酸水溶液, 涡旋混合 90 s。将离心管密封置于沸水中煮沸 5 min, 取出置于流水下冷却至室温。4500 r/min 离心 10 min, 待净化。

移取上述提取液 1 mL 于 2 mL 离心管中, 加

入 5 μL 氨水, 涡旋混匀。依次用 3 mL 20% 乙腈水溶液 (含 1% 乙酸)、3 mL 0.1% 氨水溶液活化 Supelco ENVI-Carb 固相萃取柱, 加入 500 μL 提取液, 再用 700 μL 超纯水淋洗, 正压挤干, 最后用 1 mL 20% 乙腈水溶液 (含 1% 乙酸) 洗脱收集于 5 mL 离心管中。取 200 μL 洗脱液于 1 mL 离心管中加入 600 μL 乙腈, 混匀, 过 0.22 μm 滤膜于进样小瓶中, 4°C 下保存以待分析。

(2) 液相色谱条件 样品分析在 AB SCIEX 5500 QTRAP 四极杆-线性离子阱复合质谱仪上进行。色谱柱为 TSK-Amide-80 (3 μm , 2 mm $\times$ 15 cm), 柱温 40°C , 样品温度为 4°C , 进样体积 10 μL , 流动相 A 为水 (含 2 mmol/L 甲酸铵, 50 mmol/L 甲酸), B 为 95% 乙腈水溶液 (含 2 mmol/L 甲酸铵, 50 mmol/L 甲酸), 梯度洗脱条件: 0~3.0 min, 80%B; 3.1~5.0 min, 80%~40%B; 5.1~10.0 min, 40%B; 10.1~11.0 min, 40%~80%B; 11.1~13.0 min, 80%B; 流速: 0.4 mL/min。

(3) 质谱条件 采用喷雾电离源 (ESI) 多反应监测 (MRM) 检测方式, 离子源温度为 550°C , 喷雾电压 5000 V, 气帘气压力为 20 psi, 雾化气压力为 30 psi, 辅助加热器压力为 30 psi, 碰撞气 Medium。

1.3 数据分析

采用 Excel 和 OriginPro 8 软件处理数据及作图。

各组分毒性大小以 TEF 换算成 $\mu\text{g STX eq.}$ 进行比较, 其中 STX 的 TEF=1.00。具体计算公式如下

$$\mu\text{g STX eq.} = \sum_{i=1}^n X_i r_i \quad (1)$$

式中, X_i 为各种亲水性贝类毒素的含量; r_i 为毒性因子。

2 结果与分析

2.1 塔玛亚历山大藻(AT5-3)生长与产毒能力

初始接种密度为 (7720 ± 232) cells/mL 的塔玛亚历山大藻(AT5-3), 2 d 即已进入指数生长前期, 并在第 6 天达到平台生长期, 最高生长密度为 (45640 ± 502) cells/mL (图 1)。而在此过程中, 单位体积藻液中总 PSTs 含量表现出相似的变化趋势, 同样在指数后期达到最高, 但随着生长平台期

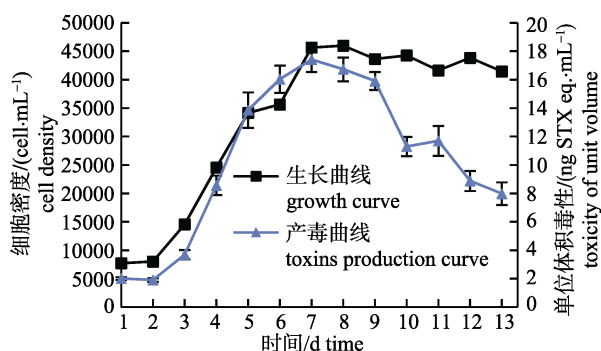


图 1 塔玛亚历山大藻 AT5-3 生长与 PSTs 产毒曲线

Fig. 1 Growth and PSTs-production curve of *Alexandrium tamarense* AT5-3

的延长, 单细胞 AT5-3 的产毒能力有所下降, 从而造成了总的产毒能力下降。由图 2 可知, AT5-3 共产生 9 种 PSTs 组分, 指数期各组分质量百分比分别为 GTX1&4 40.4%、NEO 2.64%、C1&2 52.8%、GTX2&3 1.56%、GTX5 2.43%、dcSTX 0.21%。其中, 高毒性成分($TEF \geq 0.70$)有 NEO、GTX1&4 和 dcSTX, 但仅有 GTX1&4 占有较高比例, 其他两种含量极低, 经计算指数期 AT5-3 单细胞产毒能力为 7.95 fmol/cell。

2.2 栉孔扇贝中 PSTs 毒素总量的组织差异性

暴露过程中, 投喂的塔玛亚历山大藻 AT5-3 未出现沉降现象, 且 0.5 d 取样后对海水进行显微镜计数, 均未发现藻细胞残留, 无假粪产生。经计

算, 栉孔扇贝滤食 AT5-3 的平均清滤率为 3.3 L/(ind·h), 摄食率为 1.62×10^6 cells/(ind·h), 表明栉孔扇贝对 AT5-3 具有较好的摄食性。每只贝完全摄食产毒藻需约 4.90 h, 即开始采样时(0.5 d)栉孔扇贝已完全摄入产毒藻。从图 3 可以看出, 仅仅暴露 0.5 h 后, 目标组织中均出现了 PSTs, 说明栉孔扇贝对 PSTs 具有良好的蓄积和转运作用。总体来说, 各组织中 PSTs 总毒性在暴露阶段的变化趋势相似, 都是在蓄积阶段呈现迅速上升的趋势, 直至最后一次暴露的 24 h 达到最高点(5 d), 随后总体呈现下降趋势。比较而言, 各组织对 PSTs 蓄积能力由大到小顺序为内脏团、性腺、外套膜、闭壳肌, 其中尤以内脏团蓄积能力最强, 毒素含量约为其他组织的数倍甚至数十倍, 初次暴露 0.5 h 后 PSTs 含量就已超过国际限量标准, 而且实验期间一直保持在较高水平。全部组织中 PSTs 含量均在 5 d 达到最高值, 栉孔扇贝体内实际平均毒素总量达 1903 μg STX eq./kg。根据投喂的全部藻细胞数量计, 暴露过程中投喂产毒藻中毒素总量为 2256 μg STX eq./kg, 因此栉孔扇贝对 PSTs 的整体吸收效率为 84.4%。代谢阶段, 各组织中 PSTs 均以不同速率下降, 其中内脏团中代谢毒素最快, 但代谢末期 PSTs 总量仍超出安全限量。其他组织仅外套膜在代谢阶段 5~8 d 期间含量高于安全限量, 性

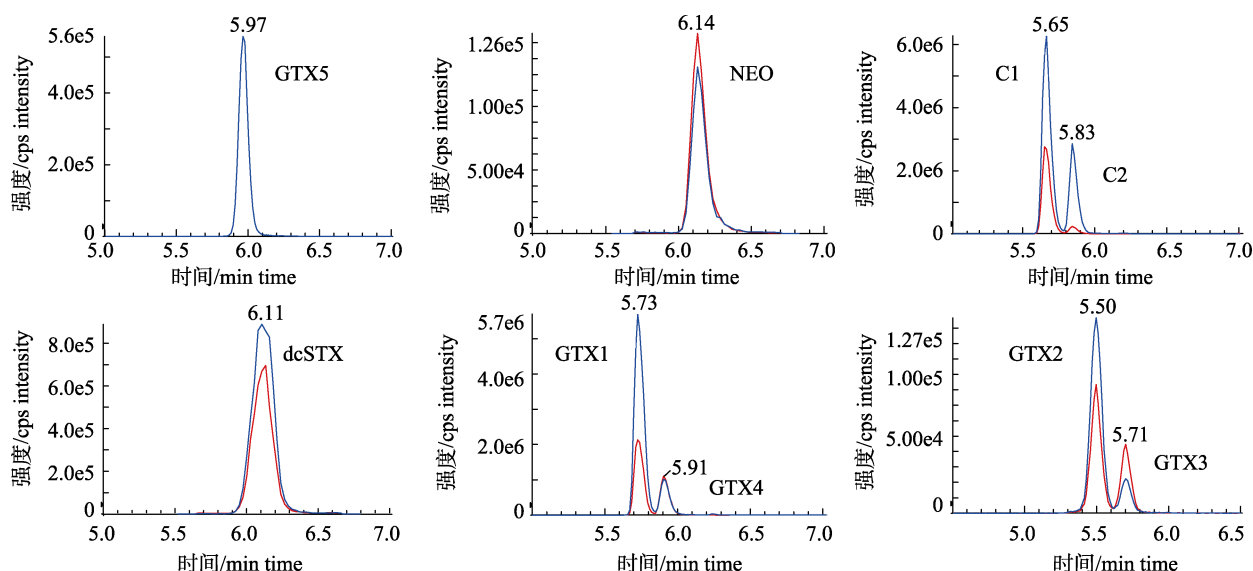


图 2 塔玛亚历山大藻 AT5-3 指数期所产 PSTs 的提取离子流图

Fig. 2 Extraction ion chromatograms of PSTs produced by *Alexandrium tamarense* AT5-3 at exponential growth phase

腺和闭壳肌中总毒素量则一直低于安全限量。

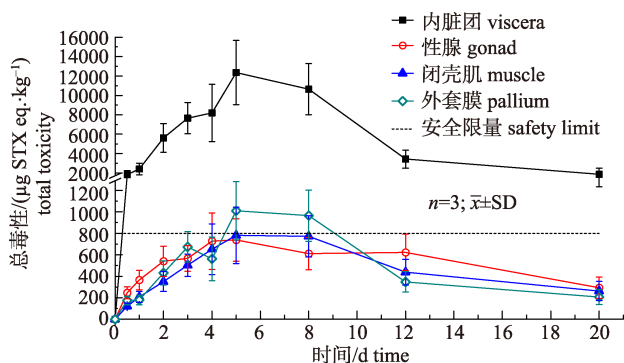


图3 栉孔扇贝各组织中 PSTs 总毒性变化
Fig. 3 Total toxicity changes of PSTs in different tissues of *Chlamys farreri*

2.3 PSTs 组分在各组织间的迁移和转化过程

一般来说,生物体内化学物质之间的转化是以等分子数转化的。因此,不同组分 PSTs 物质的量(分子数)在扇贝各组织中的改变,代表 PSTs 不同组分在扇贝体内的迁移和转化。由图4可看出,塔玛亚历山大藻进入栉孔扇贝体内 0.5 d 时的各毒素初始物质的量百分比分别为: GTX1&4(40.6%)、NEO(14.1%)、C1&2(19.9%)、GTX2&3(1.56%)、

GTX5(4.07%)、dcGTX2(4.07%),与产毒藻指数生长期时体内各毒素百分比相比,NEO 明显变大,C1&2 明显变小。由图4可知,各组织中毒素物质的量总和都是在毒素蓄积阶段呈现总体上升的趋势,在毒素代谢阶段呈现下降的趋势。整个暴露实验过程中,内脏团中 GTX1 所占物质的量百分比最大,在 2.78%~30.8%范围内波动;其次是 C1 (1.94%~25.4%)、NEO (2.52%~22.3%),且 NEO 和 GTX1&4 所占物质的量百分比随着暴露时间的延长呈现逐渐减小的趋势,C1 则呈现逐渐增大的趋势。性腺、闭壳肌、外套膜中毒素物质的量百分比变化最为明显的是 NEO,呈现出先增大后减小的趋势,不同之处在于,性腺和闭壳肌都在 4 d 达到最大值,而外套膜是在 8 d 达到最大值,其他毒素百分比变化不明显。

2.4 PSTs 组分在扇贝体内的蓄积和消除规律

PSTs 在不同组织中表现出相似的蓄积代谢规律(图3),但不同 PSTs 组分变化过程并不相同(图5)。栉孔扇贝体内同样含有 9 种 PSTs,但与产毒藻 AT5-3 所产 PSTs 种类相比,扇贝中增加 dcGTX2,而缺少 dcSTX,表明 PSTs 蓄积代谢过程中出现了

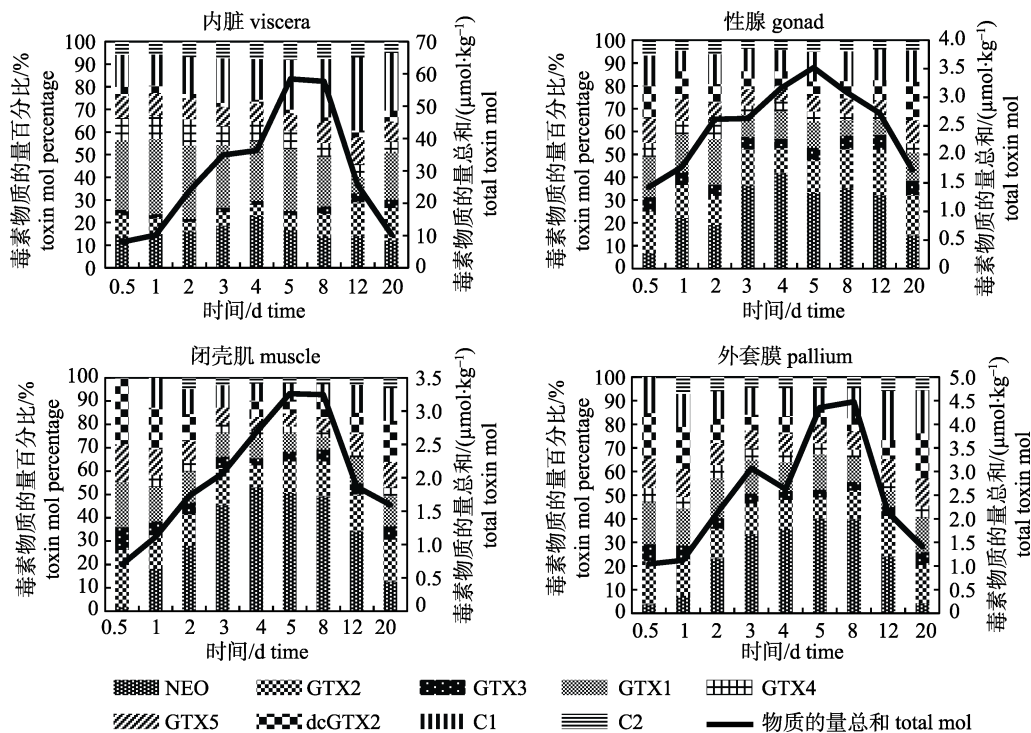


图4 PSTs 在栉孔扇贝不同组织间的迁移和转化

Fig. 4 Migration and transformation of PSTs in different tissues of *Chlamys farreri*

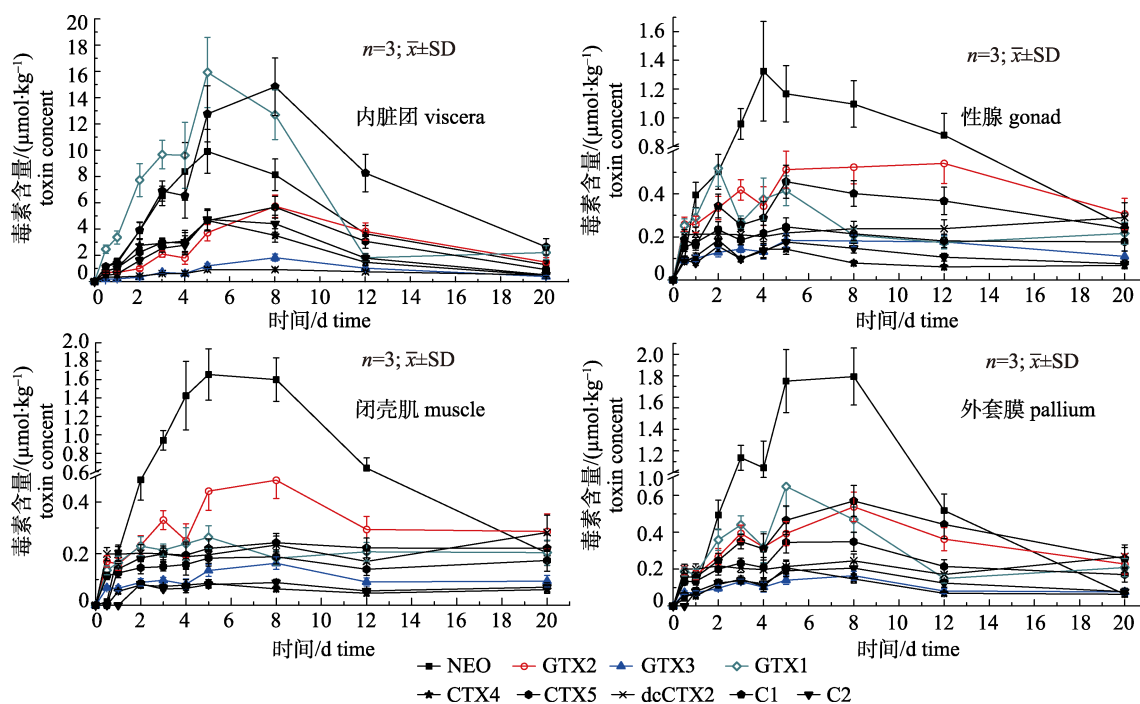


图 5 PSTs 在栉孔扇贝各组织部位的蓄积代谢规律

Fig. 5 Accumulation and depuration of PSTs in different tissues of *Chlamys farreri*

生物转化。而从不同 PSTs 组分看, 内脏团具有最强的蓄积消除能力, 这也与总毒性变化规律相似。但不同的是, 内脏团对 GTX1、C1 和 NEO 这 3 种组分的蓄积能力均较强, 而其他组织对 NEO 蓄积能力更高。同样, 不同 PSTs 组分的消除也具有一定的组织差异性。以内脏团为例, GTX1&4、NEO、C1 和 dcGTX2 在第 5 天蓄积结束时, 毒素含量即达到最高值, 而 GTX2&3、GTX5 和 C2 在代谢阶段第 3 天(8 d), 毒素含量达峰值。通过蓄积代谢速率计算^[17]得: 内脏团中 GTX1 的蓄积速度最快, 而 C1 的消除速度则最大。与内脏团不同的是, 其他组织中 NEO 的蓄积和代谢速率均最大, 其他成分则较为相似。这一过程中, 各种毒素含量变化除了自我消除外, 通过生物转化成其他毒素组分也是潜在因素。

2.5 PSTs 组分在栉孔扇贝体内的转化关系

采用比值的计算方法^[13], 明确 PSTs 从塔玛亚历山大藻到栉孔扇贝体内其同分异构体间的转化关系。塔玛亚历山大藻指数生长期时 C1/GTX2 的值为 31.70, C2/GTX3 的值为 43.70, 产毒藻被栉孔扇贝摄食 0.5 d 时, 内脏团中 C1/GTX2 的值为 1.54, C2/GTX3 的值为 2.39, 差异明显, 产毒藻

中其他毒素的比值与扇贝体内毒素的初始比值则相差不大。由图 6 可见, 实验过程中以 C1/dcGTX2、C2/GTX3 和 C1/GTX2 的变化波动最为明显。GTX2/GTX3、GTX1/GTX4、C1/C2 的值变化趋势相似, 都是在毒素蓄积阶段呈波动性变化, 在毒素排出期间呈现出明显上升的趋势, C1/GTX2、C1/dcGTX2、C2/GTX3 的值变化趋势相似, 都是在毒素累积阶段表现为波动上升, 在毒素排出期间表现为缓慢下降。

3 讨论

亚历山大藻为 PSTs 主要的产毒藻家族, 目前已发现 30 种产毒藻(株)是导致贝类中毒的主要肇事藻种^[18-20]。在我国现已发现 7 种亚历山大藻产生 PSTs 毒素, 广泛分布于我国沿海海域, 所产 PSTs 种类也有所不同^[21]。本研究所用塔玛亚历山大藻 AT5-3 分离自我国南海海域, 其所产 PSTs 毒素组分较为复杂。比较而言, 我国其他藻株所产 PSTs 毒素成分种类相对简单, 一般为 4~6 种, 主要为 C1&2、GTX1&4, 如塔玛亚历山大藻 ATJZ22 株(渤海)、ATLY04 株(黄海)^[22]等。同时与其他海域, 如南大洋海域(AT-Polar 株)和美国海域(AT-WHOI 株)的塔玛亚历山大藻产毒主要为 C2

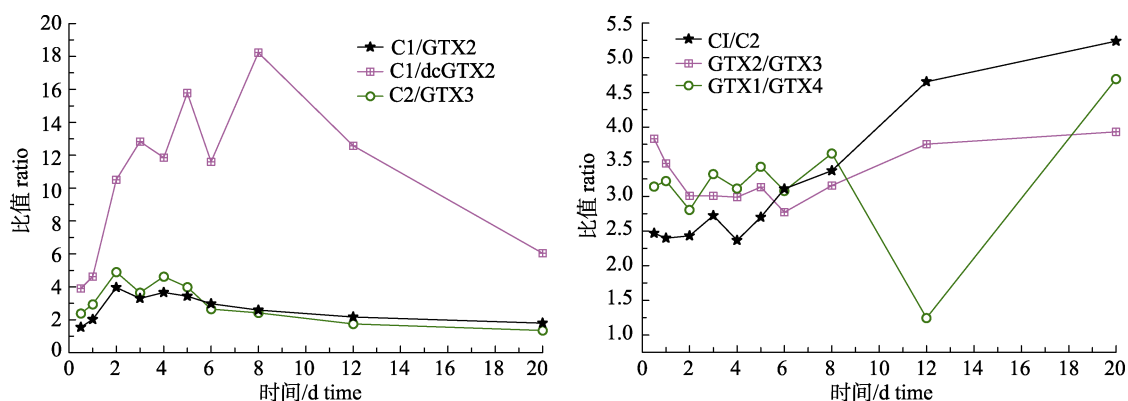


图6 栉孔扇贝内脏团中毒素含量比值变化

Fig. 6 Different toxin ratios in viscera of *Chlamys farreri*

(90.0%)^[23]相比,我国所产 AT5-3 株单细胞产毒能力更强,毒素组分也更为复杂。因此,塔玛亚历山大藻 AT5-3 株潜在生态和食品安全风险性相对较强,危害性更大,值得引起更高的关注。

研究观察,栉孔扇贝对 AT5-3 的摄食效率达到 100%,而 PSTs 的总体蓄积效率则为 84.40%(以 $\mu\text{g STX eq./kg}$ 总量计)。导致这种差异的原因可能是暴露过程中部分毒素溶解在水中,以及毒素在扇贝体内的代谢消除造成的。产毒藻和贝类体内毒素种类和组成的差异现象^[24-25],证明毒素进入栉孔扇贝体内后发生了生物转化。因此,本研究中栉孔扇贝中毒素成分较所投喂产毒藻毒素种类增加了 dcGTX2,但同时缺失了 dcSTX。另外,除了毒素间的转化,毒素在不同组织间的蓄积和代谢均存在差别^[24]。本研究中内脏团 GTX1 蓄积能力最强,而其他组织中 NEO 更易蓄积;且毒素分布比例发生改变,内脏团中 NEO 明显升高,C1 则明显降低,而其他组织中 dcGTX2 所占比例呈现先减小后增大的趋势。

暴露实验中,栉孔扇贝各组织中毒素蓄积分布存在明显差异,内脏团是 PSTs 蓄积代谢的靶器官,且内脏团中主要毒素是 GTX1、C1 和 NEO,其他组织中主要毒素是 NEO。产毒藻 AT5-3 株主要产 C1&2 (52.80%)和 GTX1&4 (40.40%),已知 NEO 的毒性明显较 C2 和 GTX4 的高,可见产毒藻经栉孔扇贝蓄积转化后,PSTs 的总毒性增强,风险性增加。

双壳贝类中,PSTs 的代谢过程中的转化作用

包括差向异构体间转化以及不同毒素种类间转化。已有研究证明,PSTs 毒素 11 位 C 原子上 -HOSO 在经提取或消化释放后会发生差向异构化转变, α 异构体会逐渐转化为更稳定的 β 异构体,如 GTX3 可转化为 GTX2;而在酶的作用下,C11 为 β 型向 α 型毒素的转化,即 GTX4→GTX1, C2→C1^[26]。图 6 中呈现的毒素间比值的变化能够反映出毒素间的相互转化关系。GTX2/GTX3、GTX1/GTX4、C1/C2 在代谢期间呈现出明显上升的趋势,而 C1/GTX2、C1/dcGTX2、C2/GTX3 在毒素排出期间表现为缓慢下降。综合分析可得,C1, C2 在实验过程中为主要的转化毒素,依据其毒素组成的变化分析可得,可能的转化趋势为 C1→GTX2、C1→dcGTX2、C2→GTX3。发生的主要转化反应包括羟基化和去磺酸化^[20]。相比之下,牡蛎体内 PSTs 则主要发生 GTX3/GTX4 的差向异构化^[27],虾夷扇贝体内存在的 PSTs 转化关系有 GTX1&4→GTX2&3→STX,和 α 、 β 异构体间的转化^[28]。

根据 Bricelja^[29]对双壳贝类毒素排出速率的划分,快/中速排毒者毒素排出率一般为 6.0%/d~17.0%/d,慢速排毒者每日排出率则通常为 0.3%/d~4.0%/d,其中栉孔扇贝属于快速蓄积和慢速排毒者。由研究中扇贝组织对 PSTs 的蓄积和代谢速度可知,栉孔扇贝具有对 PSTs 不敏感和高累积的特性,且内脏团是主要的毒素蓄积器官。栉孔扇贝各组织中的 PSTs 总毒性呈现的变化趋势与以往贝类中 PSTs 累积研究^[12-13, 24-26]相似,迅

速蓄积后缓慢代谢。扇贝个体在暴露实验末期毒素总量为 425 $\mu\text{g STX eq./kg}$, 剔除内脏团后毒素总量为 259 $\mu\text{g STX eq./kg}$ 。显然, 剔除内脏团后栉孔扇贝的食用安全性更高。因此, 为保障消费者安全, 建议食用栉孔扇贝时尽量剔除内脏团。本暴露实验, 消除阶段仅维持 16 d, 内脏团中毒素含量仍然超标, 如果以实验中内脏团最低代谢速率(130 $\mu\text{g STX eq./kg}$)为依据计算, 毒素代谢阶段至少需要维持 22 d, 内脏团中毒素含量才能低于安全食用限量(800 $\mu\text{g STX eq./kg}$), 毒素完全代谢干净则至少需要消除 26 d。因此由塔玛亚历山大藻暴发的赤潮且其浓度和维持时间同本研究相近, 即赤潮结束后, 可初步估算因此而受到污染的栉孔扇贝的海域禁捕时间为 26 d 以上。

4 结论

栉孔扇贝对塔玛亚历山大藻(AT5-3 株)具有较强摄食能力, 其对 PSTs 也具有显著的蓄积作用, 各组织间蓄积能力由高到低依次为内脏团、性腺、外套膜、闭壳肌; 研究过程中, 产毒藻被摄食进入栉孔扇贝体内并发生多种毒素间生物转化, C1、C2 为主要转化毒素, 转化趋势为 C1→GTX2、C1→dcGTX2、C2→GTX3; 栉孔扇贝各组织对 PSTs 总体表现出相似的蓄积代谢规律, 迅速蓄积后缓慢代谢, 其中内脏团蓄积代谢能力最强, 是 PSTs 毒素在栉孔扇贝体内蓄积代谢的靶器官。研究数据可用于评估 PSTs 危害的形成机制, 为系统研究我国 PSTs 风险性提供数据支持。

参考文献:

- [1] Schantz E J. Chemistry and biology of saxitoxin and related toxins[J]. Ann N Y Acad Sci, 1986, 479: 15–23.
- [2] Wang D Z, Zhang S F, Zhang Y, et al. Paralytic shellfish toxin biosynthesis in cyanobacteria and dinoflagellates: A molecular overview[J]. J Proteom, 2016, 135: 132–140.
- [3] Garcia C, María C B, Lagos M, et al. Paralytic shellfish poisoning: post-mortem analysis of tissue and body fluid samples from human victims in the Patagonia fjords[J]. Toxicon, 2004, 43(2): 149–158.
- [4] Wiese M, D'Agostino P M, Mihali T K, et al. Neurotoxic alkaloids: saxitoxin and its analogs[J]. Mar Drugs, 2010, 8(7): 2185–2211.
- [5] Peng M, Liu S D, Zhao A B. Survey on the causes and features of red tide in Lianyungang coastal waters[J]. Marine Forecasts, 2015, 32(2): 51–56. [彭模, 刘寿东, 赵爱博. 环境要素与连云港海域赤潮发生关系研究[J]. 海洋预报, 2015, 32(2): 51–56.]
- [6] Dou Y, Gao J W, Shi X T, et al. Outbreak frequency and factors influencing red tides in nearshore waters of the south China sea from 2000 to 2013[J]. Journal of Hydroecology, 2015, 36(3): 31–37. [窦勇, 高金伟, 时晓婷, 等. 2000—2013 年中国南部近海赤潮发生规律及影响因素研究[J]. 水生态学杂志, 2015, 36(3): 31–37.]
- [7] Ma F F. Biotransformation of paralytic shellfish toxins in shellfish and effect on its immune system[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012. [马菲菲. 麻痹性贝毒在贝类中的生物转化及其对机体免疫系统的影响[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.]
- [8] Andersen P, Aune T, Baden D G, et al. Report of the Joint FAO/IOC/WHO ad hoc Expert Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs[C]. Dev Potential Precambrian Miner Deposit, 2004: 409–423.
- [9] Authority E F S. Marine biotoxins in shellfish – Summary on regulated marine biotoxins[J]. EFSA J, 2009, 7(8): 1306.
- [10] Shumway S E. A review of the effects of algal blooms on shellfish and aquaculture[J]. World Aquat Soc, 1990, 21(2): 65–104.
- [11] Authority E F S. Scientific opinion on marine biotoxins in shellfish – palytoxin group[J]. EFSA J, 2009, 7(12): 1393.
- [12] Tian H, Zhang X H, Gao C L, et al. Accumulation of short term and depuration process of paralytic shellfish poisoning in Chinese scallop *Chlamys farrei*[J]. Marine Environmental Science, 2010, 29(4): 521–524. [田华, 张晓红, 高春蕾, 等. 麻痹性贝毒在栉孔扇贝体内短期的累积与排出过程[J]. 海洋环境科学, 2010, 29(4): 521–524.]
- [13] Zhu M Y, Zou Y L, Wu R J, et al. Accumulation and depuration of paralytic shellfish poisons (PSP) in Chinese scallop *Chlamys ferrerii*[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2003, 25(2): 75–83. [朱明远, 邹迎麟, 吴荣军, 等. 栉孔扇贝体内麻痹性贝毒的累积与排出过程研究[J]. 海洋学报, 2003, 25(2): 75–83.]
- [14] Zou C, Ye R M, Zheng J W, et al. Molecular phylogeny and PSP toxin profile of the *Alexandrium tamarense* species complex along the coast of China[J]. Mar Pollut Bull, 2014, 89: 209–219.
- [15] Zhao J M, Fang J G, Bao Z M, et al. Filter-feeding of three bivalves on *Alexandrium tamarense*[J]. Marine Fisheries Research, 2004, 25(4): 17–22. [赵俊梅, 方建光, 包振民, 等. 3 种滤食性贝类对塔玛亚历山大藻的摄食研究[J]. 海

- 水产研究, 2004, 25(4): 17–22.]
- [16] Boundy M J, Selwood A I, Harwood D T, et al. Development of a sensitive and selective liquid chromatography–mass spectrometry method for high throughput analysis of paralytic shellfish toxins using graphitised carbon solid phase extraction[J]. *J Chromatogr A*, 2015, 1387: 1–12.
- [17] Chou H N, Huang C P, Chen C Y. Accumulation and depuration of paralytic shellfish poisoning toxins by laboratory cultured purple clam *Hiatuladiplos linnaeus*[J]. *Toxicon*, 2005, 46(5): 587–590.
- [18] Lincoln M, Kirsten T. *Alexandrium camurascutulum* sp. nov. (Dinophyceae): a new dinoflagellate species from New Zealand[J]. *Harmful Algae*, 2002, 1(3): 295–300.
- [19] Montresor M, John U, Beran A, et al. *Alexandrium tamutum* sp. nov. (Dinophyceae): a new, non-toxic species in the genus *Alexandrium*[J]. *J Phycol*, 2004, 40(2): 398–411.
- [20] Anderson D M, Alpermann T J, Cembella A D, et al. The globally distributed genus *Alexandrium*: multifaceted roles in marine ecosystems and impacts on human health[J]. *Harmful Algae*, 2012, 14: 10–35.
- [21] Gu H F, Zeng N, Liu T T, et al. Morphology, toxicity, and phylogeny of *Alexandrium* (Dinophyceae) species along the coast of China[J]. *Harmful Algae*, 2013, 27: 68–81.
- [22] Orr R J S, Stüken A, Rundberget T, et al. Improved phylogenetic resolution of toxic and non-toxic *Alexandrium* strains using a concatenated rDNA approach[J]. *Harmful Algae*, 2011, 10(6): 676–688.
- [23] Chan L L, Sit W H, Lam P K S, et al. Identification and characterization of a “biomarker of toxicity” from the proteome of the paralytic shellfish toxin-producing dinoflagellate *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae)[J]. *Proteomics*, 2006, 6(2): 654–666.
- [24] Kwong R W M, Wang W X, Lam P K S, et al. The uptake, distribution and elimination of paralytic shellfish toxins in mussels and fish exposed to toxic dinoflagellates[J]. *Aquat Toxicol*, 2006, 80(1): 82–91.
- [25] Mohamad S, Yasunaga Y, Takefumi S, et al. Accumulation and depuration profiles of PSP toxins in the short-necked clam *Tapes japonica* fed with the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*[J]. *Toxicon*, 2006, 48(3): 323–330.
- [26] Qiu J B. Metabolic transformation of paralytic shellfish toxins by bivalve molluscs and their physiological and biochemical responses[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014. [邱江兵. 双壳贝类对麻痹性贝毒的代谢转化及其生理生化响应[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.]
- [27] Bian Z Y. Study on the accumulation, distribution, transformation for paralytic shellfish poisoning and the depuration of CM-chitosan in oyster[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2013. [卞中园. 麻痹性贝毒在牡蛎体内蓄积、分布、转化以及羧甲基壳聚糖的脱除作用研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2013.]
- [28] Wang N, Liang Y B, Song T. Accumulation, transformation and depuration of paralytic shellfish toxins by the scallop *Patinopecten yessoensis*[J]. *Marine Environmental Science*, 2013, 32(4): 565–569. [汪娜, 梁玉波, 宋涛. 麻痹性贝毒在虾夷扇贝体内累积、转化和排出过程研究[J]. *海洋环境科学*, 2013, 32(4): 565–569.]
- [29] Bricelja V M, Shumway S E. Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs: occurrence, transfer kinetics, and bio-transformation[J]. *Harmful Algae*, 1998, 315–383.

Metabolic profile of paralytic shellfish toxin in scallop *Chlamys farreri*

BING Xiaofei^{1,2}, WU Haiyan¹, WANG Qun³, LI Qingyun¹, GUO Mengmeng¹, GUO Jiao¹, ZHAI Yuxiu¹, TAN Zhijun¹

1. Key Laboratory of Testing and Evaluation for Aquatic Product Safety and Quality, Ministry of Agriculture; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
2. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
3. Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100141, China

Abstract: Paralytic shellfish toxins (PSTs) are potent neurotoxins produced by a variety of marine dinoflagellates, such as *Gymnodinium*, *Alexandrium* and *Pyrodinium*. PSTs can accumulate and be passed into the food chain through the filter feeding of toxin-producing algae by bivalve mollusks. The consumption of contaminated shellfish can cause poisoning in humans, with symptoms including nausea, vomiting, diarrhea, numbness or tingling in the extremities, and even death as a result of respiratory failure. *A. tamarense* is widely distributed along the coast of China, and often forms large algal blooms in the waters surrounding Nanhuangcheng Island, the Zhoushan area, and the port city of Xiamen. Many controlled *in vivo* feeding experiments with shellfish have investigated the accumulation and fate of PSTs toxins in the marine food web. Comparative studies of PST profiles often found significant differences between the causative dinoflagellates and contaminated bivalve mollusks, thus indicating active metabolism of the toxin in some shellfish. The scallops *Patinopecten yessoensis* and *Chlamys nipponensis* are known to become much more toxic for consumption than mussels grown under the same environmental conditions, and several months are required until the toxicity drops to an acceptably safe level. Conversely, levels of toxicity in the short-necked clam and oysters are generally low, and the toxicity can decline as quickly as in the mussel. The metabolic interconversion of incorporated toxins achieved by enzymatic and chemical reactions in the tissues of bivalves, and different uptake and depuration kinetics of the individual toxins, may each contribute to differences in the PST profiles.

In this study, we exposed scallop directly to toxin-producing algae in order to characterize the formation of PSTs in *Chlamys farreri*. Furthermore, we followed PST accumulation and metabolic biotransformation in different organs of the scallop using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The results showed that the AT5-3 strain of *Alexandrium tamarense* in separate areas of the South China Sea were stable both in their growth and toxin production. The composition of the toxin consisted mainly of gonyautoxin-1 and -4, with a cell toxin-production of 7.95 fmol/cell. Rapid accumulation of the PST was observed, while total accumulation efficiency reached 84.4%. The highest accumulation concentration was 1903 µg STX.2HCl-eq/kg. The toxin-accumulation ability of the different tissues was ordered as viscera>gonad>pallium>muscle. Moreover, the viscera showed the strongest PST metabolic ability and was also the target organ. In addition, the proportion of PST in bivalves differed from the profile of the dinoflagellate that produces the toxins. *Chlamys farreri* has a strong ability to perform biological transformation. The main transformation pathway was: N-sulfocarbamoylgonyautoxin-2 (C1) → gonyautoxin-2 (GTX2)/decarbamoylgonyautoxin-2 (dcGTX2), and N-sulfocarbamoylgonyautoxin-3 (C2) → gonyautoxin-3 (GTX3). In this experiment, *Chlamys farreri* showed characteristically rapid PST-accumulation and slow PST-metabolism; meanwhile the high ratio of the toxin component GTX1 and 4 and NEO resulted in significantly increased risk of PSTs in this scallop. This study contributes to the scientific evaluation of the formation mechanisms of PSTs, thereby providing scientific support for the monitoring of PSTs in China.

Key words: paralytic shellfish toxin; *Chlamys farreri*; *Alexandrium tamarense*; bioaccumulation; metabolism; target organs

Corresponding author: TAN Zhijun. E-mail: tanzj@ysfri.ac.cn