

原多甲藻酸贝类毒素的研究进展

李爱峰¹, 韩刚², 于仁成³

(1. 中国海洋大学 海洋环境与生态教育部重点实验室, 山东 青岛 266100; 2. 中国水产科学研究院, 北京 100039; 3. 中国科学院 海洋研究所 海洋生态与环境科学重点实验室, 山东 青岛 266071)

摘要: 近年来, 欧洲沿海地区频繁出现一种新毒素 Azaspiracid (AZA) 导致的中毒事件, 给水产品质量安全工作带来了新的挑战。目前对这类新型毒素的毒性及致毒机理还不清楚, 缺少相应的贝类毒素检测方法。为此, 本文对有关 AZA 毒素的来源、理化性质、毒性、致毒机理、检测方法等内容进行了综述, 并建议中国开展相关的研究工作, 以期帮助人们认识这一新型毒素, 为进一步开展相关研究提供参考依据。[中国水产科学, 2008, 15(1): 183-187]

关键词: 原多甲藻酸; 原多甲藻; 贝类毒素

中图分类号: X171

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2008)01-0183-05

近年来, 海洋环境遭受严重污染, 水体富营养化程度日趋严重, 有害赤潮在全球范围内频繁爆发, 其中由有毒赤潮产生的藻毒素成为污染海水养殖环境的新要素, 严重威胁水产品食用安全^[1]。近 10 年来, 在欧洲沿海地区频繁出现一种新毒素 Azaspiracid (AZA) 引起的中毒事件^[2-4]。2004 年, 由联合国粮农组织、世界卫生组织和政府间海洋委员会共同组建了服务于渔业和水产品法典委员会的双壳软体生物毒素工作组, 将 AZA 毒素归为八大类贝类生物毒素之一^[5]。据报道^[2], AZA 毒素由原多甲藻 (*Protoperidinium crassipes*) 产生, 其中毒症状与腹泻性贝毒 (Diarrhetic Shellfish Poison, DSP) 引起的中毒症状非常相似, 表现为恶心、呕吐、严重腹泻和胃肠部痉挛等症状。尽管目前中国还未见 AZA 中毒事件的报道, 但是在长江口、大连湾等海域均有多种原多甲藻分布^[6-7], 并且在大连湾沉积物中曾采集到多种未定种的原多甲藻胞囊^[8]。由此推断, 中国海域也存在产生 AZA 毒素的风险。由于人们对该毒素的认识较晚, 有关其毒性、致毒机理、检测方法等内容的报道较少。因此, 本文对现有的文献报道进行了综述与归纳, 旨在帮助人们对 AZA 毒素有一个初步的认识, 为进一步开展相关研究提供参考依据。

1 原多甲藻毒素的来源与性质

1.1 毒素的发现和来源

1995 年 11 月, 荷兰至少有 8 人在食用产自爱尔兰 Killary 海湾的紫贻贝 (*Mytilus edulis*) 后中毒, 临床症状表现为恶心、呕吐、腹泻和胃肠部痉挛等典型的 DSP 中毒症状。应用小鼠腹腔注射测试 DSP 的方法分析贝样品, 小鼠表现为肢体麻痹、呼吸困难、痉挛等症状, 严重者在 35 min 内死亡, 但未见有腹泻症状, 这与麻痹性贝毒 (Paralytic Shellfish Poison, PSP) 引起的神经性中毒症状极为相似。但在应用色谱方法分析样品的过程中未检出 PSP, 只检测到低剂量的 DSP。鉴于当时在捕捞有毒贝类的海域未发现已知产毒的浮游生物, 因此怀疑是一种新的毒素成分。后来的跟踪监测发现, Killary 海湾紫贻贝的毒性一直持续到次年 5 月份。1997 年 10 月, 在爱尔兰西北部的 Arranmore 岛发生了类似的中毒事件, 贝类毒性一直持续到次年 4 月份。在该毒性物质的纯化过程中, 发现标有 KT3 (Killary Toxin-3) 的分离组份具有毒性, 因此最初人们将该物质称为 KT3 毒素。经分离纯化得到的 KT3 活性成分是一种聚醚类毒素, 含氮和独特的螺环结构, 因带有羧基而呈酸性, 因此被命名为 Azaspiric acid, 后来人们一直简写为 AZA。

收稿日期: 2007-05-28; 修订日期: 2007-08-30.

基金项目: 国家自然科学基金 (30571426); 中国海洋大学科研启动基金 (3000-814382).

作者简介: 李爱峰 (1978-), 男, 讲师, 博士, 从事水产品贝类毒素检测方法的研究. E-mail: lafouc@ouc.edu.cn

自 AZA 化学结构确定之后,人们相继发现了它的另外 10 种衍生物,并在紫贻贝之外的其他双壳贝类体内也发现了这类毒素,如长牡蛎 (*Crassostrea gigas*)、欧洲牡蛎 (*Ostrea edulis*)、大扇贝 (*Pecten maximus*)、菲律宾蛤仔 (*Tapes philippinarum*)、鸟蛤 (*Cardium edule*) 等^[4]。AZA 在贝体内的分布不同于 DSP,不仅累积在肝胰腺中,在生殖腺和肌肉组织中也有分布。AZA 在贝类体内的累积没有明显的种属趋向性,但具有明显的季节性,在紫贻贝体内可累积 8 个月之久。据报道^[10],曾发生 AZA 中毒事件或贝类染毒的国家主要有爱尔兰、英国、挪威、荷兰、法国、西班牙和意大利。

由于已知的几种聚醚类毒素,如 DSP、蛤毒素 (Pectenotoxin, PTX)、虾夷扇贝毒素 (Yessotoxin, YTX) 等都可以由鳍藻 (*Dinophysis* spp.) 产生,因此人们最初推断 AZA 也是由鳍藻产生^[11]。但是,人们在鳍藻中一直未能找到其产生 AZA 的证据。后来的研究表明, AZA 是由一种原多甲藻 (*P. crassipes*) 产生^[2],因此,我们尝试将 Azaspiroacid 称为原多甲藻酸。鉴于原多甲藻在中国海域也有广泛的分布,这种潜在的风险应引起人们的关注,提前开展一些相关的研究工作。

1.2 毒素的化学结构和理化性质

目前已确定化学结构的 AZA 毒素有 11 种,它们是一类聚醚氨基酸,含有一个独特的 6,5,6-三螺环和一个环胺结构,其分子结构如图 1 和表 1 所

示。其中 AZA1 是最常见的类型,在贝体内毒素组成中所占比例最高。AZA2 和 AZA3 分别是 AZA1 的 8-甲基和 22-脱甲基衍生物,在有毒贝类中也比较常见,同时也存在于浮游植物样品中。AZA4 和 AZA5 是 AZA3 的 3-羟基和 23-羟基衍生物,在贝类体内含量很少。AZA6 是 AZA1 的空间异构体, AZA7-10 是 AZA1 的羟基化衍生物, AZA11 是 AZA2 的羟基化衍生物,这几种衍生物在贝类体内也有发现,但含量非常少。因此,人们认为 AZA1-3 是原多甲藻产生的天然产物, AZA4-11 是贝类经过代谢转化后的产物^[12-13]。

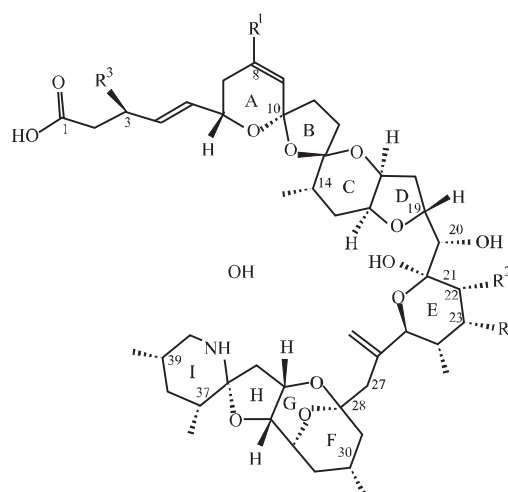


图 1 原多甲藻酸毒素的化学结构示意图^[2]

Fig.1 Structures of azaspiroacid toxins^[2]

表 1 原多甲藻酸毒素的化学结构及相对分子质量 (参考图 1)

Tab.1 Structures and molecular weights (MW) of azaspiroacid toxins (refer to Fig.1)

毒素 Toxins	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	相对分子质量 MW
AZA1	H	CH ₃	H	H	841.5
AZA2	CH ₃	CH ₃	H	H	855.5
AZA3	H	H	H	H	827.5
AZA4	H	H	OH	H	843.5
AZA5	H	H	H	OH	843.5
AZA6	CH ₃	H	H	H	841.5
AZA7	H	CH ₃	OH	H	857.5
AZA8	H	CH ₃	H	OH	857.5
AZA9	CH ₃	H	OH	H	857.5
AZA10	CH ₃	H	H	OH	857.5
AZA11	CH ₃	CH ₃	OH	H	871.5

AZA 毒素的理化性质明显区别于其他含氮生物毒素,在 1.0 mol/L 的乙酸/甲醇溶液或 1.0 mol/L 的氨水溶液中加热 150 min 后其毒性没有明显变化,在冷藏条件下可长期储存。由此看来, AZA 毒

素是一类化学性质相对稳定的化合物。

1.3 毒素的毒性和致毒机理

AZA 毒素引起的临床中毒症状包括恶心、呕吐、严重腹泻和胃肠部痉挛等,这与 DSP 引起的

中毒症状非常相似,但其毒性高于大田软海绵酸(Okadaic acid, OA)。据估算^[14],当摄入AZA1剂量为23 µg/人和86 µg/人时,致毒概率分别为5%和95%,对人的平均致毒剂量为51.7 µg/人。由联合国粮农组织、世界卫生组织和政府间海洋委员会联合成立的双壳贝类毒素专家组,初步确定了贝类毒素急性致毒的参考剂量(reference dose, RfD),其中AZA1的RfD值为0.04 µg/kg贝组织,远低于其他贝类毒素(OA的RfD值为0.33 µg/kg贝组织)^[5]。AZA1、AZA2和AZA3对小鼠腹腔注射致死剂量分别为200 µg/kg、110 µg/kg和140 µg/kg^[11]。AZA4和AZA5对小鼠腹腔注射致死剂量分别为470 µg/kg和<1 000 µg/kg^[12]。由此看来,AZA1~3毒素的毒性较高,而AZA4~5的毒性相对较低,这可能是由于贝类通过代谢转化作用降低所累积AZA1~3毒素的毒性,从而减轻对自身的毒害作用。

有关AZA的致毒机理,目前还没有一个明确的说法。小鼠口服AZA1毒素的毒性实验发现,AZA1可引起肺、胃肠、肝、淋巴组织(胸腺和脾)等多个器官组织受到不同程度的损伤,这些病变在亚致死条件下可在数月内恢复^[15]。在慢性毒性实验中出现间质性肺炎和小肠绒毛萎缩症状,严重者出现肺肿瘤细胞发育^[16]。另外发现,AZA1在低浓度(IC₅₀=2.1 nmol/L)条件下可降低小鼠脊髓神经元的生物电活性,其影响神经元突触传递的机制与门控通道无关^[17]。由此看来,向小鼠腹腔注射AZA1后表现出的急性神经毒性症状虽与PSP中毒相似,但其作用机制完全不同。

AZA1对多种细胞具有毒性,毒性大小与时间、浓度有关。研究发现,AZA1依靠自身特有的ABCDE和FGHI环结构(如图1所示)与人神经母细胞瘤作用靶点结合,导致肌动蛋白重排,这一过程不受调控细胞凋亡的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(Caspases)家族酶活性的影响^[18];AZA1在改变细胞骨架的过程中不改变膜电压,与OA相比可明显提高人淋巴细胞内环磷酸腺苷(cAMP)和胞液Ca²⁺浓度^[19];另外人T型淋巴细胞对AZA1也非常敏感,坏疽的细胞毒害症状随着与AZA1的接触而逐渐消退^[10]。由此看来,AZA的细胞毒害作用机制与OA是不同的,其通过特殊的结构基团与细胞结合,具有特定的细胞作用靶点,使得纤维肌动蛋白发生重排,从而改变细胞骨架,而OA毒素主要是通过抑制蛋白磷酸酶的活性使

蛋白发生超磷酸化所致。人们在研究AZA1~5毒素影响人淋巴细胞内Ca²⁺水平的实验中已经证实AZA的毒性效应与其化学结构有关,不同衍生物引起的效应差别较大^[20-21]。

2 原多甲藻酸的检测方法

2.1 生物测试法

对于原多甲藻酸这类新型毒素,目前还缺少标准化的生物测试方法。最初人们借鉴小鼠腹腔注射测试贝类DSP的方法分析AZA毒素,取贝类消化腺,应用丙酮提取毒素,统计小鼠死亡时间进行定量^[14]。但由于AZA在贝类体内广泛分布,消化腺内的毒素只占0~40%,因此分析结果会产生假阴性^[22]。另外,小鼠腹腔注射AZA后产生明显的神经性中毒症状,按照DSP中毒致死的统计结果进行定量分析是不可靠的。

目前在荷兰和欧盟的官方控制立法程序中比较认可小鼠口服测试AZA的结果。将贝类样品与食物混合后投喂预先饥饿的小鼠,观察其16 h内的排泄情况,结合小鼠粪便和食物残留量进行半定量分析^[23]。在AZA毒素的生物测试方法中,迄今该方法是最好的半定量分析手段,被人们广泛应用。

另外,人们基于AZA特有的细胞毒性选择肝胚细胞瘤细胞系HepG2(CRL-10741)和膀胱癌细胞(ECV-304)作为测试对象,用毒素提取液培养细胞,初步建立了AZA的细胞毒性测试方法^[24]。依据细胞形态学变化的差异,该方法可以区别DSP和AZA毒素。不过,细胞毒性测试AZA的方法还很成熟,有待于进一步完善。

2.2 液相色谱-质谱联用分析法

由于AZA毒素在波长大于210 nm的范围缺少特征吸收峰,目前还未见有液相色谱分析AZA的报道。但随着液相色谱-质谱联用(LC-MS)技术的不断完善和LC-MS在毒素分析领域的广泛应用,人们逐步建立了LC-MS分析AZA的方法^[13,25-29]。总的来讲,液相色谱分离部分可选择C₁₈反相色谱柱,如Luna-2(150 mm×2.0 mm,3 µm);选择含三氟乙酸和乙酸铵缓冲溶液的乙腈水溶液作为流动相,如65%(v/v)乙腈水溶液(含0.05%三氟乙酸和0.004%乙酸铵);应用串联质谱或离子阱质谱的选择反应监测(SRM)模式,检测AZA的质子化离子[M+H]⁺经碰撞裂解后的脱水化合物离子[M+H-nH₂O]⁺(脱水分子数n为1~3),可获得较高的灵敏度和精密

度,检出限为 5~40 pg (S/N=3)。近年来,Lehane 等^[13]应用三级质谱对 $[M+H]^+$ 和 $[M+H-H_2O]^+$ 诱捕和裂解,监测 $[M+H-2H_2O]^+$ 以及 AZA 毒素 A 环裂解后的 $[M+H-H_2O-C_9H_{10}O_2R^1R^3]^+$ 离子,建立了快速检测 AZA 毒素的方法,同时检测 AZA1~10 10 种毒素可在 7 min 内完成,检出限为 5~20 pg (S/N=3)。对于毒素的提取,研究发现应用固相萃取方法可以得到较好的回收率和重现性^[28-29]。由此看来,应用 LC-MS 技术可以快速、准确地定量分析贝类中的 AZA 毒素,但由于仪器比较昂贵,难以普及,大大限制了有关 AZA 毒素研究工作的开展。

3 存在的问题及展望

目前,原多甲藻酸导致的人中毒和贝类染毒事件在欧洲沿海国家频繁发生。尽管目前中国还未见水产品中含有 AZA 毒素的报道,但这并不能说明中国的水产品在这方面的生物毒性是绝对安全的。一方面,中国的贝类养殖数量位居海水养殖五大渔业类群的首位,贝类产量占渔业总产量的 40.7%。如此大的养殖强度和规模也造成了海水养殖环境的不断恶化,养殖水域水体富营养化问题日趋严重,赤潮频繁发生。另一方面,中国海域分布有许多未定种的原多甲藻,对其产毒与否人们还未做过检测,并且随着世界贸易的频繁往来,物种入侵现象已比较普遍,产毒藻的入侵风险较高。第三,目前中国对水产贝类中生物毒素的监测力度还远远不够,缺少对 AZA 毒素的检测方法,技术储备不足。另外,贝类积累 AZA 毒素后其外观、活力等均不发生变化,肌肉、消化腺等软组织颜色、气味等特征也不受影响,难以从感官辨别有毒的贝类产品。因此,国内应积极开展 AZA 毒素的研究工作,并将之作为一种技术储备以应对突发事件的发生,提高中国对水产贝类毒素的监测能力。建议开展这样几项研究工作:贝类中 AZA 毒素的风险评估工作,研究其毒性效应及致毒机理;建立 AZA 毒素的 LC-MS 分析方法;开展养殖海域浮游植物的调查工作,尤其是对已见报道的贝毒产毒藻的调查,评价养殖水域环境的风险。

参考文献:

- [1] 周名江,于仁成. 有害赤潮的形成机制、危害效应与防治对策[J]. 自然杂志,2007,29(2): 72-77.
- [2] James K J, Moroney C, Roden C, et al. Ubiquitous 'benign' alga emerges as the cause of shellfish contamination responsible for the human toxic syndrome, azaspiracid poisoning[J]. *Toxicon*, 2003, 41(2): 145-151.
- [3] Hess P, Nguyen L, Aasen J, et al. Tissue distribution, effects of cooking and parameters affecting the extraction of azaspiracids from mussels, *Mytilus edulis*, prior to analysis by liquid chromatography coupled to mass spectrometry[J]. *Toxicon*, 2005, 46: 62-71.
- [4] Okolodkov Y B. The global distributional patterns of toxic, bloom dinoflagellates recorded from the Eurasian Arctic[J]. *Harmful Algae*, 2005, 4: 351-369.
- [5] Toyofuku H. Joint FAO/WHO/IOC activities to provide scientific advice on marine biotoxins (research report) [J]. *Mar Poll Bull*, 2006, 52(12): 1735-1745.
- [6] 王金辉. 长江口邻近水域的赤潮生物[J]. 海洋环境科学, 2002, 21(2): 37-41.
- [7] 栾青杉,孙军,宋书群,等. 长江口夏季浮游植物群落与环境因子的典范对应分析[J]. 植物生态学报, 2007, 31(3): 445-450.
- [8] 王朝晖,齐雨藻,江天久,等. 大亚湾近代沉积物中甲藻孢囊的垂直分布[J]. 水生生物学报, 2004, 28(5): 504-510.
- [9] Satake M, Ofuji K, Naoki H, et al. Azaspiracid, a new marine toxin having unique spiro ring assemblies, isolated from Irish mussels, *Mytilus edulis* [J]. *J Am Chem Soc*, 1998, 120: 9967-9968.
- [10] Twiner M J, Hess P, Dechraoui M-Y B, et al. Cytotoxic and cytoskeletal effects of azaspiracid-1 on mammalian cell lines[J]. *Toxicon*, 2005, 45: 891-900.
- [11] Ofuji K, Satake M, McMahon T, et al. Two analogs of azaspiracid isolated from mussels, *Mytilus edulis*, involved in human intoxication in Ireland[J]. *Natural Toxins*, 1999, 7(3): 99-102.
- [12] Ofuji K, Satake M, McMahon T, et al. Structures of azaspiracid analogs, azaspiracid-4 and azaspiracid-5, causative toxins of azaspiracid poisoning in Europe[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2001, 65: 740-742.
- [13] Lehane M, Sáez M J F, Magdalena A B, et al. Liquid chromatography-multiple tandem mass spectrometry for the determination of ten azaspiracids, including hydroxyl analogues in shellfish[J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1024: 63-70.
- [14] EU/SANCO. Report of the meeting of the working group on toxicology of DSP and AZP[R]. Brussels, 2001.

- [15] Ito E, Satake M, Ofuji K, et al. Multiple organ damage caused by a new toxin azaspiracid, isolated from mussels produced in Ireland[J]. *Toxicon*, 2000, 38: 917–930.
- [16] Ito E, Satake M, Ofuji K, et al. Chronic effects in mice caused by oral administration of sublethal doses of azaspiracid, a new marine toxin isolated from mussels[J]. *Toxicon*, 2002, 40: 193–203.
- [17] Kulagina N V, Twiner M J, Hess P, et al. Azaspiracid-1 inhibits bioelectrical activity of spinal cord neuronal networks[J]. *Toxicon*, 2006, 47: 766–773.
- [18] Vilariño N, Nicolaou K C, Frederick M O, et al. Irreversible cytoskeletal disarrangement is independent of caspase activation during *in vitro* azaspiracid toxicity in human neuroblastoma cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 2007, 74(2): 327–335.
- [19] Román Y, Alfonso A, Louzao M C, et al. Azaspiracid-1, a potent, nonapoptotic new phycotoxin with several cell targets[J]. *Cell Signall*, 2002, 14: 703–716.
- [20] Alfonso A, Román Y, Vieytes M R, et al. Azaspiracid-4 inhibits Ca^{2+} entry by stored operated channels in human T lymphocytes[J]. *Biochem Pharmacol*, 2005, 69: 1 627–1 636.
- [21] Alfonso A, Vieytes M R, Ofuji K, et al. Azaspiracids modulate intracellular pH levels in human lymphocytes[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 346: 1 091–1 099.
- [22] James K J, Lehane M, Moroney C, et al. Azaspiracid shellfish poisoning: unusual toxin dynamics in shellfish and the increased risk of acute human intoxications[J]. *Food Addit Contamin*, 2002, 19(6): 555–561.
- [23] Van Egmond H P, Aune T, Lassus P, et al. Paralytic and diarrhoeic shellfish poisons: Occurrence in Europe, toxicity, analysis and regulation[J]. *J Nat Toxins*, 1993, 2(1): 41–83.
- [24] Flanagan A F, Callanan K R, Donlon J, et al. A cytotoxicity assay for the detection and differentiation of two families of shellfish toxins[J]. *Toxicon*, 2001, 39: 1 021–1 027.
- [25] Ofuji K, Satake M, Oshima Y, et al. A sensitive and specific method for azaspiracids by liquid chromatography mass spectrometry[J]. *Natural Toxins*, 1999, 7(6): 247–250.
- [26] Draisci R, Palleschi L, Ferretti E, et al. Development of a method for the identification of azaspiracid in shellfish by liquid chromatography–tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr*, 2000, 871A: 13–21.
- [27] Lehane M, Magdalena A B, Moroney C, et al. Liquid chromatography with electrospray ion trap mass spectrometry for the determination of five azaspiracids in shellfish[J]. *J Chromatogr*, 2002, 950A: 139–147.
- [28] Moroney C, Lehane M, Magdalena A B, et al. Comparison of solid-phase extraction methods for the determination of azaspiracids in shellfish by liquid chromatography–electrospray mass spectrometry[J]. *J Chromatogr*, 2002, 963A: 353–361.
- [29] James K J, Sierra M D, Lehane M, et al. Detection of five new hydroxyl analogues of azaspiracids in shellfish using multiple tandem mass spectrometry[J]. *Toxicon*, 2003, 41: 277–283.

Progresses in studies of azaspiracid poisoning

LI Ai-feng¹, HAN Gang², YU Ren-cheng³

(1. Key Laboratory of Marine Environment and Ecology, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266100, China; 2. Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100039, China; 3. Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: Recently, poisoning incidents resulting from consumption of shellfish contaminated by azaspiracid (AZA) toxins occurred frequently along the coastal areas of Europe, which has become a new challenge to the seafood safety. So far little information is available on the toxicity and mechanism of AZA and its derivatives, and the analytical methods for AZA toxins in shellfish are still not popular. This paper reviewed the recent progresses made on AZA poisoning, including the origin, the physical and chemical properties, toxicity, mechanism of intoxication, and analytical methods of AZA, based on the published references. It was suggested that related studies on AZA should be carried out in China to help people understand the new toxins comprehensively and to present scientific basis for potential monitoring and management of AZA poisoning in the future. [Journal of Fishery Science s of China, 2008, 15(1): 183–187]

Key words: Azaspiracid; *Protoperidinium* sp.; shellfish toxins