

文章编号: 1004-7271(2002)03-0283-06

·综述·

海洋生物中毒素的研究进展

Advances in the study of toxin in halobios

王 艳, 周培根, 戚晓玉

(上海水产大学食品学院, 上海 200090)

WANG Yan, ZHOU Pei-gen, QI Xiao-yu

(College of Food Science, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

关键词: 毒素; 河豚毒素; 芋螺毒素; 海葵毒素

Key words: toxin; tetrodotoxin; conotoxin; anthopleirin toxin

中图分类号: S917 文献标识码: A

在海洋生物中, 存在一类高活性的特殊代谢成分, 即海洋生物毒素。海洋生物毒素资源丰富, 种类多, 分布广, 据估计有 1000 多种, 其中已确定结构的有几十种。海洋生物毒素是海洋天然产物的重要组成部分, 亦是海洋生物活性物质中研究进展最迅速的领域, 海洋生物毒素具有结构奇特, 活性广泛且活性强等特点。海洋生物毒素具有独特的药理活性, 是典型的海洋生物药物。多数海洋生物毒素均有较强的神经毒性, 而且作用于神经离子通道, 因而对神经系统起重要作用。本文主要报道了河豚毒素、芋螺毒素和海葵毒素这几年的研究进展, 其它几种毒素做了简要概述。

1 河豚毒素

河豚毒素(Tetrodotoxin, TTX)是从河豚鱼中分离出来的一种电压敏感的 Na^+ 通道外口的特异性阻滞剂, 对神经、肌肉、浦金野氏纤维等兴奋细胞膜的 Na^+ 通道均具有高度专一性, TTX 最初用于治疗麻风患者的神经痛, 是一种较强的镇痛剂, 作用较缓且持久, 曾代替吗啡、杜冷丁等治疗神经痛, 且无成瘾性, 它比常用麻醉药强万倍以上。河豚毒素是一类高值的生物活性物质, 高纯度的河豚毒素, 国际市场的价格为每克几十万美元。作为“分子探针”, TTX 因其高选择性和高亲合性地阻断神经兴奋膜上 Na^+ 通道而成为鉴定、分离和研究 Na^+ 通道的重要工具药。已发现的河豚鱼毒素(见图 1)有七种天然衍生物, 它们因其致死率、对细胞过敏膜钠通道特殊阻断功能而成为最重要的海洋毒素之一。

1.1 河豚毒素的生物活性

河豚毒素是一种毒性很强的海洋神经毒素, 近年来发现它具有很好的镇痛作用。TTX 对神经细胞的钠通道有着高度的阻滞作用, 可阻断神经冲动的传导, 因此能产生明显的局部麻醉作用。TTX 相对与盐酸普鲁卡因具有作用时间长特点, TTX 对粘膜的穿透力弱, 没有表面麻醉作用。但由于河豚毒素的毒性较大, 且其药物动力学情况知之不多, 使得其不能广泛使用。目前在临床使用上具体有以下几个用途:

(1) 镇痛 :含 TTX 的注射剂可用于治疗神经痛、癌痛、关节痛、肌肉痛、麻风痛以及创伤、烧伤等引起的疼痛。

(2) 局部麻醉 :TTX 能产生明显的局部麻醉作用 ,目前在国际市场上 TTX 以专利出售。

(3) 镇静 :作为瘙痒镇静剂 ,对于皮肤痒症、痒疹、疥癣、皮炎等可以止痒而促进其痊愈。也可用作呼吸镇静剂 ,治疗气喘和百日咳等症。

(4) 镇痉 :作为解痉剂 ,用于松弛肌肉、胃和其他痉挛 ,尤其对破伤风痉挛有效。

(5) 降压 :TTX 有独特的降血压效果 ,可以考虑在临床上用于抢救高血压病人。

(6) 抗心律失常 :河豚毒素有明显的抗心律失常活性 ,如与其他抗心律失常药物配用 ,一定可显著增强对心律失常的疗效。

(7) 其他 :TTX 还可用于颈淋巴结核、霍乱、遗尿等疾病。

1.2 河豚毒素的结构及其毒理

自六十年代以来 ,证实河豚毒素高选择地阻断神经兴奋膜上钠离子通道。早期提出的作用方式认为毒素分子与通道蛋白上狭窄的离子选择性过滤器内孔上的受体作用 ,类似“孔塞”式阻滞离子通透^[1,2]。现在认为受体更可能位于膜的外层离子孔口附近 ,毒素作用类似于“孔塞” ,阻滞离子通透。TTX 能阻止 Na^+ 进入细胞内 ,因而可阻止神经、肌肉产生兴奋。由于化学方面的困难 ,直到七十年代中期才得到和合成了一些 TTX 的衍生物 ,并在此基础上进行了初步的构效关系和作用方式的研究 ,TTX 的活性基团主要是 1,2,3-胍胺基及附近的 C-4、C-9、C-10 碳原子的羟基。胍胺基在生理 pH 条件下发生质子化 ,形成正电性活性区域 ,可能和受体蛋白的负电性羧基相互结合 ,其周围羟基可能以氢键形式与受体结合。1994 年新加坡报道 TTX 可能影响大脑系统功能使人昏迷 ,但在一段时间后完全恢复显示了 TTX 的不积累性^[3]。有关 TTX 的毒理还有待进一步研究。

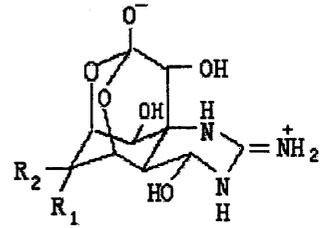


图 1 河豚毒素的结构式

Fig. 1 The structure formula of Tetrodotoxin

2 芋螺毒素

芋螺毒素 (Conotoxin CTX) 是一类由 10~30 余个氨基酸残基组成的小肽 ,含两对或三对二硫键 ,是迄今发现的最小核酸编码的动物神经肽毒素。按其作用部位分为 α 、 ω 、 μ 、 δ 等亚型 ,每种亚型仍可细分。 α -CTX 作用于神经突触后乙酰胆碱受体 (AChR) ,起阻断作用 ; ω -CTX 专一阻断神经末梢突触前电压敏感型 Ca^{2+} 通道 ; μ -CTX 在活化相起作用 ,专一抑制电压敏感型 Na^+ 通道 ; δ -CTX 专一作用于电压敏感型 Na^+ 通道 ,在非活化相起作用 ,延长动作电位持续时间。芋螺毒素结合在神经和肌肉的受体上 ,具有“高亲和力、高度专一”特点 ,是神经科学十分有效的探针。临床上用作特异诊断试剂 ,作为镇痛药具有疗效确切、不成瘾特点。数种芋螺毒素已申请美国专利。目前的最新质谱技术可精确测定 1~2 pmol 芋螺肽的分子量和初级结构 ,甚至不经层析分离就可以分析混合物。

2.1 芋螺毒素的结构、药理和构效关系

对 CTX 的结构、药理和构效关系的研究主要集中在 α 、 ω -CTX 上 ,对其它亚型研究较少。利用二维 NMR、CD 及 X-射线晶体衍射等手段着重研究了它们的空间结构、构效关系及其与受体的特异结合性质。

2.1.1 α -CTX

Gehrmann 等^[4]研究了 α -CTX GI 二硫键三种连接形式 ,通过 NMR 方法发现天然型的 α -CTX GK (2-7,3-13) 最完美。在 5 位和 11 位氨基酸残基之间主要是一个扭曲的 310-螺旋结构。Maslennikov 等^[5]利用二维 NMR 分析 α -CTX GI 在水中的空间构型。发现 α -CTX GI 呈现两种可以相互转化的拓扑异构体 ,

出现概率分别为 78% 和 22%。Rogers 等^[6]研究了 α -CTX IMI(见图 2)的溶液结构,它的特点是由两个二硫键形成两个紧密的环(loop),形成被一深裂隔离的两个亚区域。Hu 等^[7]利用 X-射线晶体衍射技术研究了 α -CTX PnIB 的晶体结构,并与 α -CTXPnIA、GI(见图 2)的结构做了比较。PnIB(见图 2)是斜方晶,属于 $P2_12_12_1$ 空间结构。Shor^[8]等利用二维 HN - MR 谱确定了 α -CTX MI(见图 2)水溶液的三维结构,发现了 14 种具有最低能量的结构。Ashcom 等^[9]用荧光素标记于 α -CTX GI(FGI)的 N-末端,利用旋转柱(Spin-Column)技术,发现 FGI 与电鳗发电器官 nAChR 的结合是独特的剂量依赖型的紧密结合,毒素结合在受体的一个位点上,有饱和性质,解离常数 K_D 为 41.3 ± 8 μ mol/L。Qniram 等^[10]研究了 α -CTXIMI 的构效关系。它的 Asp5 所带的负电荷及其适宜的侧链长度是毒素活性所必需的,而 Arg7 所带的正电荷及其适宜的大小也是毒素活性所必需的。

2.1.2 ω -CTX

Kim 等^[11]研究了 ω -CTX GVIA 的 CD 谱并与 ω -CTX MVIIA 和 ω -CTX MVIIC 的 CD 谱作比较,发现 GVIA(见图 2)与后两者尽管在三维结构上十分相似,但 CD 谱差异极大。前者在 200nm 附近有正性 cotton 效应,后两者的 CD 谱相似,表明它们的 CD 谱与三维结构无明显关系。Hirata 等^[12]发现纳摩尔级浓度的 ω -CTX GVIA、MVIIA、MVIIC 即可阻断大鼠输精管抽动反应,机理可能是抑制 Ca^{2+} 进入突触前 N 型 Ca^{2+} 通道从而抑制释放 ATP。Marian Price-Carter 等^[13]研究了 ω -CTX MVIIA 中二硫键对该毒素稳定性和肽段折叠的影响。发现每个二硫键均对毒素稳定的构象有重要贡献,缺少任何一个二硫键都会导致毒素变成不规则二级结构,大幅度降低与 Ca^{2+} 通道的结合能力并变得更容易被还原。Lew 等^[14]通过功能鉴定发现 ω -CTX GVIA 中 Lys2 和 Tyr13 被 Ala 取代能使毒素效价减少 2 个数量级,Arg17、Tyr22 和 Lys24 被 Ala 取代能使毒素效价大幅下降(< 100 倍)。GVIA 对 N 型 Ca^{2+} 通道的高亲和性是通道结合位点与多个毒素的作用位点相互作用的结果。Marian Price-Carter 等^[15]研究了 ω -CTX MVIIA 折叠成熟过程,结果表明,MVIIA - Gly 中的 Gly 能增加毒素的稳定性,使其在最适条件下折叠效力增加 80%,而 Pro- ω -CTX MVIIA 的前体部分并不能增加效能。通过鸡的脑突触受体结合实验发现,MVIIA - Gly 的结合能力比 MVIIA 降低 10 倍,Pro- ω -MVIIA 则降低了约 100 倍。

目前已人工合成出一种名为 Ziconotide(芋螺毒素多肽)的新药,其类似于 ω -CTX 的分子结构。临床试验表明,此药能抑制人体的强烈疼痛,因为它能作用于脊髓神经中 N 型钙离子通道,使疼痛信号传递受阻,从而发挥镇痛作用。Ziconotide 有望成为继吗啡之后又一个强止痛剂,而且无成瘾性。另外,通过对芋螺毒素的基因工程和药物研究,进行了芋螺毒素的基因克隆、毒素分离、合成、活性筛选及结构测定。通过基因工程技术获得了一种含 25 个氨基酸残基、三对二硫键的新芋螺毒素,该毒素具有强烈的镇痛活性及很高的用药安全性,试验表明镇痛效果优于美国产品,且毒副作用小,目前已申请专利,并有望成为我国具有知识产权的 I 类镇痛新药(见图 3)。

	氨基酸序列
IMI	G C C S D P R C A - - W - R - C
PnIA	G C C S L P P C A A N N P D Y C
PnIB	G C C S L P P C A L S N P D Y C
MI	G C C S N P V C H L E H S N L C
ω -CTX	
MVIIA	CKGKGAKCSRMLYDCCTGS-C-R-SGK-C
MVIIB	CKGKGASCHRTSYDCCTGSCNR--GK-C
MVIIC	CKGKGAPCRKTMVDCCSGSCGR-RGK-C
MVIID	CQGRGASCRKTMYNCCSGSCNR--GR-C
GVIA	CKSOGSSCSOTSYNCCR-SCNOYT-KRC--Y
CVIIA	CKSOGTCSRGMRDCT-SCLLYSNK-CRRY
SVIA	CRSSGSO CGVTSI-CC-GRC--YRGK-CT

图 2 α -CTX 和 ω -CTX 氨基酸序列

Fig.2 Amino acid sequence of α -CTX & ω -CTX



图 3 芋螺毒素多肽的空间结构(核磁共振)

Fig.3 The space structure of Conotoxin(by NMR)

3 海葵毒素

海葵毒素(Anthoplexin AP)是目前最强的冠状动脉收缩剂,海葵毒素已作为强心药物的重要先导化合物。例如从海葵提取的海葵毒素 ATX-2,是一种有 47 个氨基酸的多肽,分子量为 4770。它能选择性地作用于细胞膜的“钠通道”,能增加心肌收缩的力量,延长电冲动在肌肉中传递的时间。它还是一种研究心肌和神经膜兴奋现象的有效工具。据报道,德国一家公司已在市场上出售这种药物。

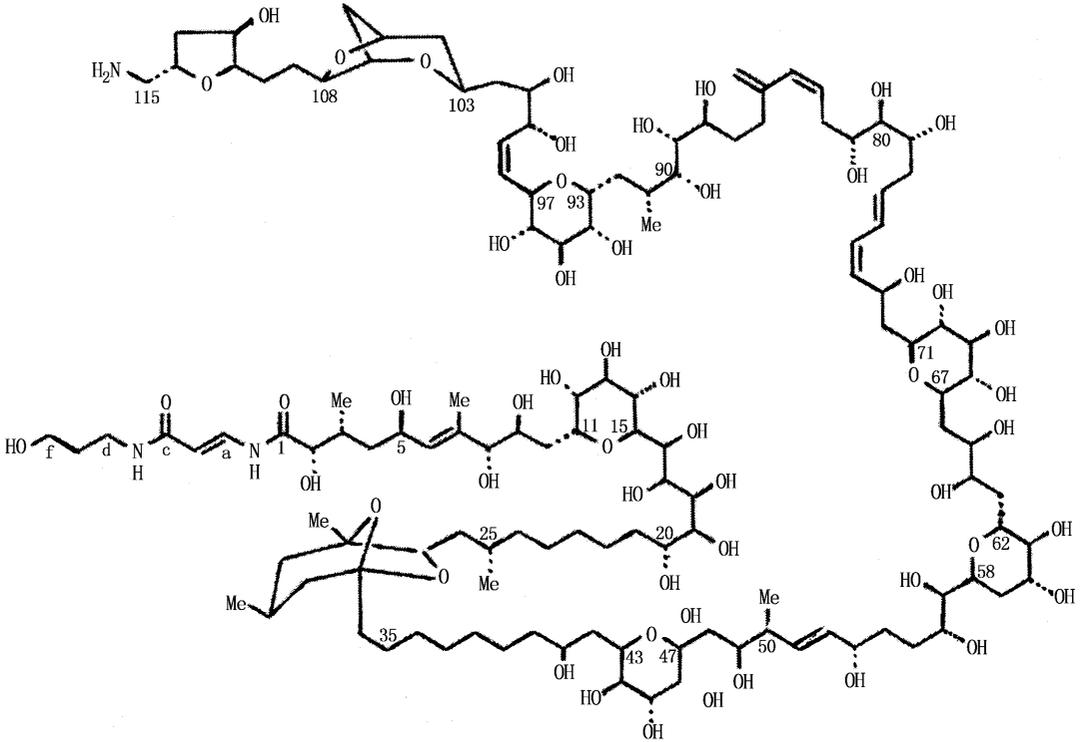


图 4 海葵毒素的结构式

Fig. 4 The structure formula of Anthoplexin toxin

3.1 海葵毒素的结构及其合成

海葵毒素用等离子解吸质谱法(PDMS)测出分子量为 2681.1 ± 0.15 , 分子式为 $C_{129}H_{223}N_3O_{54}$, 具有 64 个不对称中心。其结构确定主要通过 $NaIO_4$ 氧化,使分子在邻羟基位置切为多个片段;臭氧化,将分子的双键位置切断,得到多个结构片段。确定片段的化学结构后,批接反推出化学结构。在全合成之前,进行了较完整的立体化学研究(见图 4)。

完成海葵毒素全合成的是哈佛大学的 Kishi^[16]等,该化合物的结构确定过程为全合成奠定了基础。他主要是通过合成 8 个关键结构片段(C_1-C_7 , C_8-C_{22} , $C_{23}-C_{37}$, $C_{38}-C_{51}$, $C_{52}-C_{75}$, $C_{76}-C_{84}$, $C_{85}-C_{98}$, $C_{99}-C_{115}$)。这些片段又通过立体选择性引入双键对接,而得到海葵毒素整个分子。合成这样庞大且手性中心众多的分子,引入双键对接分子片段是关键,各分子片段中的保护基团十分重要。全保护海葵毒素羧酸带有 8 种 42 个保护基,通过不同方式脱去保护基团后,再完成最后合成。工程之艰巨,可想而知,合成艺术亦显示空前娴熟。

3.2 海葵毒素的种类及药理

海葵毒素主要有 AP-A 和 AP-B 两种,AP-A 特异结合在心脏 Na^+ 通道上,AP-B 对心脏和骨骼肌的 Na^+ 通道均能紧密结合,它们都有显著的强心作用。除此二种海葵毒素外,Kelso 等^[17]从黄海葵

(*Anthopleura xanthogrammica*) 中发现 6 种新毒素。其中 5 种类似从横沟海葵(*Anemonia sulcata*) 及其他海葵中分离得到的 47 个残基的 I 型长肽, 还有一种是两种 49 肽的嵌合体。用离子流方法在 RT-4B 和 NIE-II5 细胞系中分别纯化和定性, 一种命名为 PCR2-1047 肽能增加藜芦定依赖型的 Na^+ 摄入, 在 RT-4B 和 NIE-II5 种细胞系中的 $K_{0.5}$ 分别为 329nmol/L 和 1354nmol/L; 49 肽与 Na^+ 通道结合更紧密, 在上述两种细胞系中的 $K_{0.5}$ 分别为 47nmol/L 和 108nmol/L。

4 其它毒素

来源于水母(Jellyfish) 触手的毒素具有溶血、心脏毒性、神经毒性、肌肉毒性、皮肤坏死作用、影响离子运转及酶样活性^[18]。这些作用有相关性, 多数毒素具有几种不同的作用, 且毒素的作用还与浓度、纯度有关。被水母蛰伤后, 能产生疼痛、水肿、神经抑制、严重时心跳停止、麻痹以至死亡。水母毒素有望在研制独特功效的心血管药及研究神经、分子生物学的工具药方面有应用前景。

头足毒素(cephalotoxin) 也称章鱼毒素^[19], 是从乌贼及多种章鱼唾液腺中得到的活性物质, 含低分子胺类、蛋白质和肽。头足毒素不耐热, 能被胰蛋白酶灭活。初步实验表明头足毒素可能是一种糖蛋白。它具有提高冠脉血流的能力, 能改善心肌生化指标, 消除胸骨后疼痛, 静注可提高人血液纤维蛋白溶解活性, 防止血栓形成。其血管舒张作用超过硝酸甘油 1000 ~ 10000 倍。可望开发成抗心绞痛药物。

海胆毒素存在于海胆的生殖腺和叉棘中, 可溶于水。白棘三列海胆(*Tripheustes gratilla*) 的球状叉棘中存在高毒物质, 这类毒素不可透析, 在 pH4.3 ~ 10.6 范围内是稳定的, 但在 45.0 ~ 47.5℃ 时就被灭活。海胆(*Lytechinus variegatus*) 球状叉棘的盐水提取物含有毒性物质可透析, 不耐热, 在 0.25mol/L NaOH 溶液中保温 1 ~ 2h 就被破坏, 有类似乙酸胆碱样作用。

海蛇毒素中常见的是半环扁尾海蛇(*Laticaudza semifasciata*) 的毒素(latictoxin) I ~ V^[20]。海蛇的毒性比陆上最毒的蛇毒还要强得多, 其毒液是多种蛋白质混合物, 包括酶、多肽和小肽, 多肽占 90% 左右。它们均能高度专一性地结合乙酰胆碱受体, 阻断突触传递, 引起麻痹, 多以呼吸肌麻痹导致死亡。现已证明, 多种海蛇毒素有一个共同的抗原, 利用免疫学方法制备出抗蛇毒血清可用来治疗蛇毒中毒, 海蛇毒素在心血管、抗血栓用药方面将大有作为。

海兔毒素(dolastoxin) 从截尾海兔(*Dolabella auricularia*) 中分离得到一种抗肿瘤的活性成分, 它是含量很低的九肽; 从海兔分离得海兔毒素 1 ~ 9, 迄今唯一确定海兔毒素 3 的结构为: 环 Pro-Leu-Val-(Gln)-Thz-(Gly)-The。海兔毒素 3 含有两种新的少见的噻唑氨基酸 (Gln)-Thz 及 (Gln)-ThZ。它强烈抑制细胞生长, 具有抗 P_{388} 白血病及 B_{15} 黑色素瘤作用。有人按海兔毒素 3 的结构进行了人工全合成, 但合成的环多肽无生物活性。

微囊藻素(microcystin) 是从蓝细菌(cyanobacteria) 即蓝菌(藻), 主要是从铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*) 中发现的一大类 50 多种结构相似的环肽类肝脏毒素。Mc demott 等^[21] 观察微囊藻素-LR 对大鼠肝细胞、人成纤维细胞、人内皮细胞、大鼠早幼粒细胞的形态、生化、特别是对细胞程序性死亡的影响。结果发现, 在 30min 内微囊藻素(0.8 μM) 使肝细胞膜呈水泡样, 细胞萎缩, 细胞器位置变化, 染色质浓缩, 呈典型的细胞程序性死亡。其它细胞在高剂量(100 μM) 下也发生类似形态变化, 但需较长时间, 多数细胞的 DNA 断裂, 出现“梯子”样构型。

5 结语

综上所述, 海洋生物中的这些毒素具有性质独特、作用专一、剂量低、效果显著的特点。其中以河豚毒素、芋螺毒素和海葵毒素最受关注, 它们有极强的生物学活性, 相信此类毒素在未来为人类战胜病患, 探索生命奥秘会开辟新的道路。

参考文献:

- [1] Baden D G. Marine food-borne dinoflagellate toxins[C]. Review Cytology , 1983 , 82 - 99 .
- [2] Kao C Y. Structure-activity relations of tetrodotoxin , saxitoxin and analogues[C]. Annals of the New York Academy of science , 1986 , 52 .
- [3] Tambyah P A. Central-nervous-system effects of tetrodotoxin poisoning[M]. Lancet , 1998 , 343 : 538 - 539 .
- [4] Gehmann J. Structure determination of the three disulfide bond isomers of α -conotoxin GI : a model for the role of disulfide bond in structural stability[J]. J Mol Biol , 1998 , 278 : 401 .
- [5] Maslennikov I V. Two distinct structures of α -conotoxin GI in aqueous solution[J]. Eur J Biochem , 1998 , 254 : 238 .
- [6] Rogers J P. NMR solution structure of α -conotoxin Iml and comparison to other conotoxins specific for neuronal nicotinic acetylcholine receptors [J]. Biochemistry , 1999 , 38 (13) : 3874 .
- [7] Shu-Hong Hu. Crystal structure at a resolution of α -conotoxin PnIB comparison with α -conotoxin PnIA and G[J]. Biochemistry , 1997 , 36 (38) : 11323 .
- [8] Ki-Joon Shon. Three-dimensional solution structure of α -conotoxin MI , an $\alpha_3\beta_2$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor-target edligand[J]. Biochemistry , 1997 , 36 (50) : 15693 .
- [9] Ashcom J D. Characterization of α -conotoxin in teractions with nicotinic acetylcholine receptor and monoclonal antibodies[J]. Chem J , 1997 , 328 : 245 .
- [10] Quiram P A. Characterization of α -conotoxin Iml essential for binding to neuronal α_7 receptors[J]. The Journal of Biological Chemistry , 1998 , 273 (18) : 11007 .
- [11] Kim J. Circular dichroism spectra of calcium channal antagonist ω -conotoxin[J]. Biochemical and biophysical , 1997 , 203 (1) : 133 .
- [12] Hirata H. ω -conotoxins block neurotransmission in therat vas deferences by binding to gifferent presynaptic sites on the N-type Ca^{2+} channe[J]. Biochemistry , 1997 , 36 (29) : 321 .
- [13] Price-carter M. Roles of individual disulfide bonds in the stability and folding of an ω -conotoxin[J]. Biochemistry , 1998 , 37 (27) : 9851 .
- [14] Lew M J. Structure-function relationships of ω -conotoxin GVIA[J]. The Journal of Biological Chemistry , 1997 , 272 (18) : 12014 .
- [15] Price-carter M. Folding of ω -conotoxin influence of precursor sequences and protein disulfide isomeras[J]. Biochemistry , 1996 , 35 (48) : 15547 .
- [16] Kishi R E. Science[M], 1971 . 172 , 495 - 498 .
- [17] Kelso G J. Identification and characterization of novel sodium channel toxins from the sea anemone Anthopleura xanthogrammica[M]. Toxin , 1998 , 36 (1) : 41 .
- [18] Richard Benzinger. A specific interaction between the cardiac sodium channel and site-3 toxin anthopleurin B[J]. The Journal of Biological Chemistry , 1996 , 271 (1) : 80 .
- [19] 张奕强 , 许时波. 水母的化学和药理学研究概况[J]. 中国海洋药物 , 1999 , 18 (1) : 43 .
- [20] 关美君 , 丁 源. 我国海洋药物主要成分研究概况[A]. 中国第五届海洋湖沼药物学术开发研讨会(上册)[C], 1998 : 58 .
- [21] Modermott C M. The cyanobacterial toxin microcystin-LR can induce apoptosis in a variety of cell types[M]. Toxin , 1998 , 36 (12) : 1981 .

下期文章摘要

诺氟沙星与牛血清白蛋白及卵清蛋白结合物的合成

周大勇, 戚晓玉, 陈舜胜, 周培根

(上海水产大学食品学院, 上海 200090)

摘要 采用碳二亚胺法制备诺氟沙星与牛血清白蛋白(BSA)的结合物,作为诺氟沙星酶联免疫用的免疫原。经紫外光谱法测定,每分子牛血清白蛋白连接的诺氟沙星分子数为16.1个。分别用碳二亚胺法和混合酸酐法制备诺氟沙星与卵清蛋白(OA)的结合物,作为诺氟沙星酶联免疫测定用的包被抗原。经紫外光谱法测定,每分子卵清蛋白连接的诺氟沙星分子数分别为5.8和1.9个。

关键词 诺氟沙星;牛血清白蛋白;卵清蛋白;酶联免疫吸附测定