

虾夷扇贝毒素对 ICR 小鼠小脑浦肯野细胞 毒性作用的初步研究

庞敏^{1,2}, 高春蕾², 王宗灵^{1,2*}, 唐学玺¹

(1. 中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003;

2. 国家海洋局第一海洋研究所, 山东 青岛 266061)

摘要:以雌性 ICR 小鼠为研究对象,尾静脉注射虾夷扇贝毒素 24 h 后处死,通过脑组织切片,苏木精伊红染色、甲苯胺蓝染色以及钙结合蛋白 S-100 免疫染色,研究了虾夷扇贝毒素对小鼠浦肯野细胞的毒性作用。结果表明,尾静脉注射虾夷扇贝毒素的小鼠小脑浦肯野细胞细胞质有明显变化,同时在光学显微镜下观察到细胞核有收缩而用钙离子结合蛋白 S-100 的免疫荧光染色结果表明,虾夷扇贝毒素作用后,小鼠浦肯野细胞的 S-100 蛋白表达增多,而其他组织则没有明显变化。浦肯野细胞形态学以及细胞内钙离子结合蛋白的变化说明虾夷扇贝毒素可能对神经细胞有毒性作用。

关键词: 虾夷扇贝毒素; 浦肯野细胞; 细胞毒性; 钙离子结合蛋白

中图分类号: R 996.3; S 917

文献标识码: A

中国是海洋水产养殖大国,尤其是扇贝、牡蛎等养殖,产量居世界首位。近年来,由于水体富营养化而导致的赤潮频繁爆发。赤潮的发生不仅严重破坏海洋生态系统的健康,而且部分的赤潮藻所产毒素,能够随着藻体被贝类、鱼类等生物所摄取,通过食物链向上层传递,进而危害人类健康,严重时甚至可以导致死亡。我国沿海存在多种有毒赤潮藻种,其毒素所引发的中毒事件屡有发生,这就迫切需要了解这些赤潮藻毒素的作用机理,以期有效控制海产品的食用安全。

虾夷扇贝毒素(yessotoxins, YTXs),包括 YTX 以及它的衍生物,是脂溶性的巯基聚醚类化合物,最早是从日本虾夷扇贝中被分离出来^[1],后来陆续在挪威、新西兰^[2]、意大利^[3]、智利^[2]、俄罗斯、美国等国的贝类中被检出。目前,已知的 YTXs 生物来源主要为 3 种藻类:网状原角藻(*Protoceratium reticulatum*),多边舌甲藻(*Lingulodinium polyedrum*),具刺膝沟藻(*Gonyaulax spinifera*)^[4]。由于常和 OA、DTXs 等

腹泻性贝类毒素(diarrehtic shellfish poisoning, DSP)成分一起被检出,而且 YTXs 和 DSP 毒素一样,具有亲脂性聚醚结构,因此过去很长一段时间内都将其归类到 DSP 中。然而与腹泻性贝毒不同的是, YTXs 并不会造成实验动物的腹泻^[1,5],而且也不会使蛋白磷酸酶 2A 失活,所以很多学者都认为不能将其继续归类为 DSP^[6],因此欧盟委员会于 2002 年正式将此种毒素从腹泻性贝毒中分离出来单独列为一类。目前 YTXs 越来越受到世界各研究机构的重视,对其毒性作用的研究,发现虽然 YTXs 不像 DSP 一样具有腹泻、恶心等明显症状,但是腹腔注射实验表明, YTXs 对心肌、肝脏和胰脏都有损伤^[7-10],而近年来的一些研究发现, YTXs 对 Swiss CD1 大鼠脑神经细胞也有一定的损伤作用^[11-12],但其对人类健康的危害程度以及作用机理尚不完全清楚,因此 YTXs 的生物毒性作用不容小觑。

2007 年中国海洋环境质量公报显示,在我国韭山列岛东部海域曾爆发过具刺膝沟藻赤潮事

件,2007年7月在青岛沙子口海域也曾爆发过具刺膝沟藻赤潮。我国近海海洋综合调查与评价项目(简称908专项)调查中,对我国沿海的多个海域的贝类样品进行检测,发现多种经济水产养殖贝类中含有YTXs,而多次在黄渤海的底质泥样中发现存在网状原角藻、具刺膝沟藻以及多边舌甲藻的孢囊。由于产YTXs的藻种不是赤潮多发种,且食用沾污YTXs的贝类后没有明显的中毒症状,因此其潜在威胁性常被忽视,对虾夷扇贝毒素毒性及毒性作用机理的研究在我国尚属空白。

本文主要通过ICR小鼠尾静脉注射YTX标准物质24h后处死,取脑组织固定,通过苏木精伊红染色、甲苯胺蓝染色,进而研究YTX对小鼠小脑浦肯野细胞的损伤作用,并以OA为阳性对照,来比较YTX与OA对浦肯野细胞的毒性大小。由于YTX的毒性作用可能与钙离子有关,因此通过免疫组织染色,对脑组织中钙离子结合蛋白S-100的表达变化情况进行研究,以期进一步了解虾夷扇贝毒素YTX对人类可能造成的影响,并探讨其可能的危害机制,为我国海洋环境保护、海洋水产和食品卫生部门的水产品安全检测提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雌性ICR小鼠,体重20g左右,购自青岛药品检验研究所,实验室内暂养一周后用于动物实验。

1.2 实验试剂

毒素标准物质 YTX标准物质(5.46 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、OA标准物质(25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)购自加拿大国家海洋生物研究所(National Research Council, Marine Analytical Chemistry Standards Program, NRC-CRM, Institute for Marine Biosciences, Halifax, Nova Scotia, Canada)

化学试剂与染料 苦味酸、甲醇、乙醇、甲醛、冰乙酸、二甲苯、伊红、苏木精、柠檬酸钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氯化钠均为国产分析纯;用于免疫组化的一抗为鼠抗S-100,二抗为通用型SABC-Cy3,均购自武汉博士德生物工程有限公司,用前1:100稀释。

1.3 实验方法

动物实验 实验前小鼠禁食16h,不禁水,

用苦味酸将实验用鼠标记分组称重。

将YTX以及OA标准物质用注射用氯化钠稀释,参考了文献[9]中YTX及OA的腹腔注射半致死剂量分别为512 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、225 $\mu\text{g}/\text{kg}$,小鼠的静脉注射最大耐受容量是0.2 mL,而YTX标准物质浓度为5.46 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、OA标准物质浓度为25 $\mu\text{g}/\text{mL}$,因此YTX注射用量为25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ OA的注射用量为22.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。设置相应浓度的甲醇作为空白对照。

尾静脉注射各组小鼠0.2 mL稀释液,注射后观察24h,主要观察中毒反应及死亡率,期间继续禁食不禁水;24h后,将其处死解剖,取其脑组织进行固定,配制1 L固定液配方如表1。

表1 固定液配方

Tab. 1 Recipes of fixative solution

试剂 reagent	体积(mL) volume
95%乙醇 ethanol	330
甲醛 formaldehyde	220
冰乙酸 acetic acid	115
蒸馏水 distilled water	335

石蜡切片制作与组织学H.E染色 固定24h后放入70%冰乙醇中继续固定72h后的脑组织,经常规脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋到制作石蜡切片,连续切片厚度为6 μm 。

按常规方法进行H.E和甲苯胺蓝染色,显微镜下观察。

S-100免疫组织染色 水浴锅加热0.01 mol/L的柠檬酸钠缓冲液(pH 6.0)至95 $^{\circ}\text{C}$,放入切片加热10 min;pH 7.3的PBS缓冲液漂洗切片5 min后,加入羊血清封闭液室温封闭20 min,吸水纸洗去多余液体;加入一抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h,0.01 mol/L的PBS洗2 min \times 3次;滴加对应二抗37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min,0.01 mol/L的PBS洗2 min \times 3次;滴加SABC-Cy3,37 $^{\circ}\text{C}$ 0.01 mol/L的PBS洗2 min \times 3次;水溶性封片剂封片,荧光显微镜观察。

2 结果

对小鼠的脑组织进行组织切片后H.E染色及甲苯胺蓝染色(图1)。图1为尾静脉注射22.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ OA和25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ YTX后的ICR小鼠小脑浦肯野细胞。由图可以看出与对照组和OA组相

比较, YTX 组浦肯野细胞明显收缩, 而且细胞质着色较深, 且细胞核轮廓不清晰且收缩变小。

甲苯胺蓝作为一种碱性染料, 可以与神经细胞中的尼氏小体结合, 与 OA 注射组及甲醇对照组相比, YTX 注射组的小鼠脑组织尼氏小体变化不明显。

进一步对甲醇对照组和 YTX 注射组小鼠小脑切片进行钙离子结合蛋白 S-100 免疫染色发现 (图 2), 与对照组相比, YTX 注射组小鼠小脑浦肯野细胞细胞质有明显的荧光增强现象, 说明 YTX 能刺激细胞质中 S-100 蛋白表达的增多。

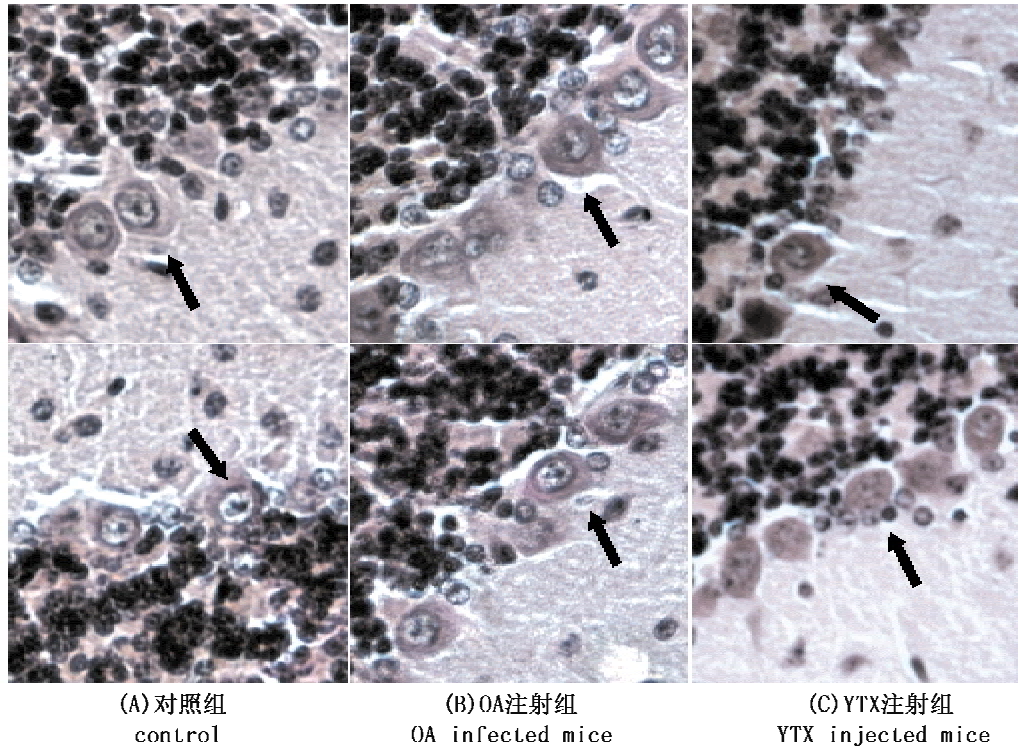


图 1 对照组与尾静脉注射 OA、YTX 小鼠脑组织切片 H. E 染色结果 (400 ×)
Fig. 1 Cross sections of cerebellum cortex from control (A), OA injected mice (B) and YTX injected mice (C) stained with hematoxylin-eosin (H. E)

3 讨论

虾夷扇贝毒素 YTXs 很长一段时间内被认为是腹泻性贝毒的一种, 但是它既不能造成腹泻, 也不会引起蛋白磷酸酶 2A 失活。本实验以腹泻性贝毒的一种大田软海绵酸 (okadaic acid, OA) 与 YTX 进行对比, 比较其细胞毒性的异同。而本实验主要研究对象是 ICR 小鼠的小脑浦肯野细胞。浦肯野细胞层是小鼠小脑叶片上的一层单列细胞层, 胞体呈梨形或烧瓶形, 核大而圆, 染色质少, 核仁明显。浦肯野细胞是小脑皮质中最大的神经元, 便于进行观察和实验研究。

对比静脉注射 YTX、OA 组的小鼠与对照组的小鼠小脑浦肯野细胞, 可以发现 YTX 对神经细胞具有一定程度的毒性, 其细胞质染色加深, 细胞

体积变小, 出现凋亡症状。尼氏小体与神经元细胞的功能有着密切的联系, 正常的神经细胞含有一定数量的尼氏小体, 其主要化学成分是核糖核酸及蛋白质, 为一种含铁质的核酸蛋白。尼氏小体主要分布于神经细胞的胞浆中, 是一种嗜碱性颗粒, 能被大部分的蓝色染料如亚甲蓝 (methylene blue)、甲苯胺蓝 (toluidine blue) 等所染色。不同神经元尼氏小体的大小和形状不一样。正常情况下, 各种神经元的尼氏小体皆有特定数量和特征的形态分布, 病理状态下, 当神经细胞变性时, 尼氏小体的变化甚为敏感, 逐渐有块状或颗粒状变为粉末状, 甚至消失。本实验中 YTX 对尼氏小体的影响并不明显。

对脑组织切片进行 S-100 抗体的特异性免疫染色发现, YTX 处理组小鼠的小脑浦肯野细胞的

S-100 表达量增多,这与 Franchini 等^[11]所做的通过腹腔注射 Swiss CD1 小鼠的研究结果一致。而 S-100 蛋白是一种酸性钙结合蛋白,分子量 21 ku,主要存在于中枢神经系统各部的星状神经胶质细胞的胞液中,一般认为,当中枢神经系统细胞损伤时 S-100 蛋白从胞液中渗出进入脑脊液(CSF),再经受损的血脑屏障进入血液。因此,CSF 和血液中 S-100 蛋白增高是中枢神经系统损伤特异和灵敏的生化标志。这些实验都说明 YTX 对神经细胞有毒性作用,而 S-100 又是一种

钙结合蛋白,因此可能的机理就是 YTX 可作用于与 Ca^{2+} 相关的蛋白质,如钙离子通道蛋白,使之处于打开状态,进而引起 Ca^{2+} 内流、 Ca^{2+} 浓度升高,使得膜电位去极化,从而导致膜电位失衡,引发细胞的一系列不正常反应;同时, YTX 的作用可以使线粒体膜通透性转换孔(PTP 孔)打开,使得凋亡因子向细胞质内释放,从而导致细胞凋亡被激活^[13-14]。细胞凋亡被激活,引发细胞发生一系列变化,比如染色质压缩从而成致密碱性染色加深,细胞体积变小同时密度变大等。

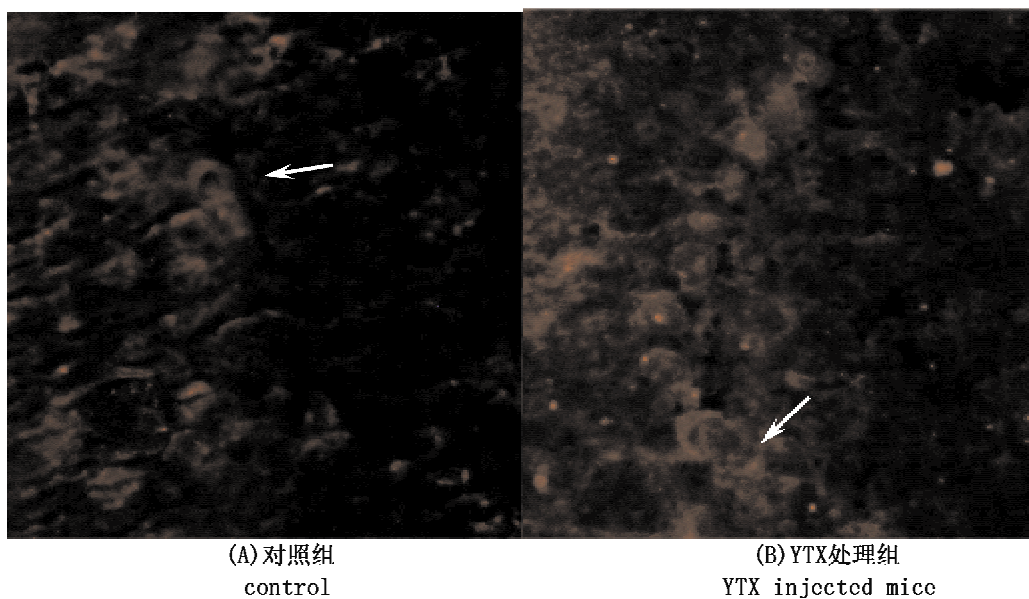


图2 对照组与尾静脉注射 OA、YTX 小鼠脑组织切片 S-100 免疫荧光染色结果(400 ×)

Fig.2 Cross sections of cerebellum cortex from control(A), and YTX injected mice(B) stained with immunofluorescence of calcium binding protein S-100

本实验还对心脏组织进行了切片观察,但是并没观察到明显组织学变化,初步判断 YTX 对心脏组织的毒性作用较弱。本实验只是通过静脉注射的方式初步研究了 YTX 对小鼠脑组织的毒性作用并通过免疫染色印证了这种毒性作用可能与钙离子的浓度变化有关,而关于 YTX 及其具体作用机理将在今后的研究中进一步进行探讨。

参考文献:

- [1] Murata M, Kumagai M, Lee J S, *et al.* Isolation and structure of yessotoxin. a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning[J]. *Tetrahedron Lett*, 1987,28: 5869 - 5872.
- [2] Yasumoto T, Takizawa A. Fluorometric measure-

ment of yessotoxins in shellfish by highpressure liquid chromatography [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1997,61: 1775 -1777.

- [3] Satake M, MacKenzie L, Yasumoto T. Identification of *Protoceratium reticulatum* as the biogenetic origin of yessotoxin[J]. *Nat Toxins*, 1997,5: 164 -167.
- [4] Howard M D A, Silver M, Kudela R M. Yessotoxin detected in mussel (*Mytilus californicus*) and phytoplankton samples from the U. S. West Coast [J]. *Harmful Algae*, 2008,(1):646 -652.
- [5] Ogino H, Kumagai M, Yasumoto T. Toxicologic evaluation of yessotoxin [J]. *Nat Toxins*, 1997,(5):255 -259.
- [6] de-la-Rosa L A, Alfonso A, Vilarino N, *et al.* Modulation of cytosolic calcium levels of human

- lymphocytes by yessotoxin, a novel marine phycotoxin[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2001, 61:827-833.
- [7] Aune T, Sorby R, Yasumoto T, *et al.* Comparison of oral and intraperitoneal toxicity of yessotoxin towards mice[J]. *Toxicon*, 2002,40: 77-82.
- [8] Tubaro A, Giangasper A, Ardizzone M, *et al.* Ultra structural damage to heart tissue from repeated oral exposure to yessotoxin resolves in three months [J]. *Toxicon*, 2008,51:1225-1235.
- [9] Tubaro A, Sosa S, Carbonatto M, *et al.* Oral and intraperitoneal acute toxicity studies of yessotoxin and homoyessotoxins in mice[J]. *Toxicon*, 2003, 41: 783-792.
- [10] Tubaro A, Sosaa S, Altinier G, *et al.* Short-term oral toxicity of homoyessotoxins, yessotoxin and okadaic acid in mice[J]. *Toxicon*, 2004,43: 439-445.
- [11] Franchini A, Marchesini E, Poletti R, *et al.* Acute toxic effect of the algal yessotoxin on Purkinje cells from the cerebellum of Swiss CD1 mice [J]. *Toxicon*, 2004, (43): 347-352.
- [12] Franchini A, Marchesini E, Poletti R, *et al.* Lethal and sub-lethal yessotoxin dose induced morpho-functional alterations in intraperitoneal injected Swiss CD1 mice[J]. *Toxicon*, 2004, (44): 83-90.
- [13] Bianchi C, Fato R, Angelin A, *et al.* Yessotoxin, a shellfish biotoxin, is a potent inducer of the permeability transition in isolated mitochondria and intact cells [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004,1656:139-147.
- [14] Malagoli D, Casarini L, Ottaviani E. Algal toxin yessotoxin signalling pathways involve immunocyte mussel calcium channels [J]. *Cell Biology International*, 2006,30: 721-726.

Preliminary studies on toxicity induced by yessotoxin (YTX) on Purkinje cells from the cerebellum of ICR mice

PANG Min^{1,2}, GAO Chun-lei², WANG Zong-ling^{1,2*}, TANG Xue-xi¹

(1. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. The First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao 266061, China)

Abstract: Yessotoxin (YTX) and its analogues are disulfated polyether compounds which have been concerned more in seafood quality monitoring and shellfish industries recently. Many studies on the toxicity of YTXs had been carried out, but the results showed apparent discrepancies. Just these discrepancies have encouraged many researchers to study the mechanism by which YTX exerts its action, such as what the target tissues are, what the pattern of the mode and precise mechanism of action are. However, the process still remains largely unclear. This paper aims to study the toxicity of yessotoxin and analyze the possible action mechanism to the nerve tissue by using histological and immunohistochemical methods. 24 hrs after tail intravenous injection with yessotoxin, the female ICR mice were killed and cerebella tissue was fixed and sliced. Hematoxylin-eosin (HE) staining used to study the effects of yessotoxin on nerve cells shows obvious morphological changes of Purkinje cells in cerebella tissue, such as shrinkage, deep staining of cytoplasm, non-mottled Nissl's body and so on. According to the immunohistochemical staining of calcium binding protein S-100, there is a more positive response to YTX in test group than in control group. It seems that YTX induces the increase of Ca^{2+} concentration in Purkinje cells of mice cerebellum; it is identical to the results of other researches. To our knowledge, this is the first report of the toxicity of YTX on nervous system in China, but the work is preliminary and further studies are needed, such as the relationship between the action mechanism of YTX and Ca^{2+} signal transduction.

Key words: yessotoxins; Purkinje cells; cytotoxic; calcium binding protein

Corresponding author: WANG Zong-ling. E-mail: wangzl@fio.org.cn