

米氏凯伦藻溶血毒素的溶血反应特征

崔伟民¹, 杨维东^{1,2*}, 刘洁生^{1,2}, 李宏业¹

(1. 暨南大学生物工程学系, 广州 510632; 2. 水体富营养化与赤潮防治广东省高等学校重点实验室, 广州 510632)

摘要:探讨了温度、pH值、二价阳离子等对米氏凯伦藻(*Karenia mikimotoi* Hasen)溶血毒素溶血活性的影响,分析了米氏凯伦藻溶血毒素的溶血反应特征。结果表明,实验室培养米氏凯伦藻的溶血活性约为 $64.69 \pm 6.43 \text{ HU L}^{-1}$, 单个藻细胞的溶血活性为 $6.17 \pm 0.61 \times 10^{-6} \text{ HU}$; 在实验温度($0 \sim 37^\circ\text{C}$)下,溶血活性随温度的增加而增加;pH 6.0 时的溶血活性最高; Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Hg^{2+} 等对米氏凯伦藻的溶血活性的影响不同。离子浓度为 5 mmol/L 时, Hg^{2+} 的抑制作用最强。高浓度 Hg^{2+} 对红细胞的集合效应不但阻止了 Hg^{2+} 进入血细胞诱导的溶血作用,而且阻止了毒素对细胞膜的破坏,但这种抑制作用可被 EDTA 消除。

关键词:米氏凯伦藻; 溶血毒素; 温度; pH; 二价阳离子

中图分类号:Q176

文献标识码:A

文章编号:1005-3395(2009)03-0237-05

Hemolytic Properties of Hemolytic Extracts from *Karenia mikimotoi* Hasen

CUI Wei-min¹, YANG Wei-dong^{1,2*}, LIU Jie-sheng^{1,2}, LI Hong-ye¹

(1. Department of Biotechnology, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. Guangdong Province's Higher Education Key Laboratory of Eutrophication and Red Tid Control, Guangzhou 510632, China)

Abstract: The effects of temperature, pH and different divalent cations on the hemolysis induced by *Karenia mikimotoi* Hasen were studied, and the hemolytic properties were analyzed. The results showed that the hemolytic activity of *K. mikimotoi* was $64.69 \pm 6.43 \text{ HU L}^{-1}$ and $6.17 \pm 0.61 \times 10^{-6} \text{ HU cell}^{-1}$. The hemolytic activity increased with the temperature enhanced at $0^\circ\text{C} \sim 37^\circ\text{C}$. pH had an obvious effect on the haemolytic activity, and there was the highest activity at pH 6.0. When the concentration was 5 mmol/L , the divalent cations such as Cu^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} and Hg^{2+} had different inhibition on the hemolysis, which Hg^{2+} was the strongest inhibitor. High concentration of Hg^{2+} induced a rapid and cooperative cell aggregation, and then prevent penetration of Hg^{2+} into the cells, which did not only avoid any haemolysis induced by the Hg^{2+} entrance, but also inhibited the destruction by the hemolytic toxin. However, this phenomenon could be eliminated by EDTA.

Key words: *Karenia mikimotoi* Hasen; Hemolytic toxin; Temperature; pH; Divalent cations

米氏凯伦藻(*Karenia mikimotoi* Hasen)是一种典型的鱼毒性赤潮藻,为世界广布种,常见于温带和热带浅海水域^[1]。根据现有的赤潮评价标准,米氏凯伦藻细胞密度达到 $10^6 \text{ cells L}^{-1}$ 以上时,即可形成米氏凯伦藻赤潮。自从1986年厦门西港区发生疑似米氏凯伦藻赤潮以来,米氏凯伦藻赤潮在我国频繁爆发,造成了养殖业的严重损失。1998年,珠江

口海域发生的米氏凯伦藻赤潮给粤港两地的海水养殖业造成毁灭性打击,直接经济损失3.5亿元。此后几年间,中国广大海域也经常发生生态危害严重、经济损失惨重的米氏凯伦藻赤潮。迄今为止关于赤潮发生的机制尚无定论,但是目前的大多数研究者比较赞同的观点是:赤潮生物的存在是形成赤潮的内因;环境因素(温度、盐度、海水富营养化和

收稿日期:2008-08-26 接受日期:2008-12-20

基金项目:国家自然科学基金-广东省联合基金重点项目(U0733006);国家自然科学基金项目(30470321)资助

* 通讯作者 Corresponding author

气候等)的突变是其形成的外因。而环境因素是否也对赤潮藻次生代谢物的特性有所影响,目前研究还比较少。彭喜春等^[2]已发现环境因子对球形棕囊藻溶血毒素的活性影响比较大,从而直接影响赤潮的危害。而米氏凯伦藻次生代谢物是否也受环境因子影响,目前不得而知,本文就此进行研究。

米氏凯伦藻产生的溶血毒素可能是造成鱼类大量死亡的主要原因之一。虽然其成分和结构还不是十分清楚,但研究显示糖脂和不饱和脂肪酸可能是其主要组份^[3-4]。Matthew 等^[5]报道,米氏凯伦藻中的一种游离不饱和脂肪酸和二半乳糖基单酰甘油能使鱼致死。Yasumoto 等^[6-7]指出,米氏凯伦藻溶血毒素是一种含有两个不饱和脂肪酸的糖基二乙酰基甘油,水解之后可产生一个去糖基甘油酯(lysoglycoglycerolipid)和一个多不饱和脂肪酸;米氏凯伦藻中溶血活性最高的物质是 octadecapentaenoic acid(18:5 n-3, OPA)。Parrish 等^[4]指出,米氏凯伦藻中的单半乳糖甘油二酯和双半乳糖甘油二酯具有溶血毒性。另外还有报道,一种来自米氏凯伦藻赤潮的特性不明的溶血毒素对长须鲸(*Balaenoptera physalus*)鳃的上皮细胞能造成严重的损害,导致深海无脊椎动物的死亡^[8]。王朝晖等^[9]指出,溶血毒素可造成鱼鳃小叶上皮细胞增生、邻近鳃小叶粘连、上皮细胞脱落、鳃血管破裂、血细胞渗出等病理现象,进一步引致鱼类呼吸困难,导致鱼类死亡;藻密度过大引致鳃组织堵塞缺氧并非米氏凯伦藻赤潮引起鱼类死亡的主要原因。目前,针对米氏凯伦藻溶血毒素的研究多集中在其成分的分析 and 鉴定等方面^[3-8],有关溶血反应特征的研究尚未见报道。本文拟通过温度、pH 值、二价阳离子等对米氏凯伦藻溶血毒素溶血活性的影响分析等,探讨米氏凯伦藻溶血毒素的溶血特征,以期为进一步阐明米氏凯伦藻溶血毒素的溶血机制、正确评价和认识米氏凯伦藻赤潮的危害提供参考和依据。

1 材料和方法

1.1 藻种

米氏凯伦藻(*Karenia mikimotoi* Hasen)由暨南大学吕颂辉教授提供,分离自中国南海赤潮高发区。

1.2 藻的培养

米氏凯伦藻的培养采用 f/2 培养基。培养基按照 Guillard 1962 年改良配方配制,并用孔径 0.22 μm

纤维滤膜除菌得到。取对数生长末期的米氏凯伦藻,用血细胞计数板计数并计算其细胞密度后接种,接种密度约为 $5.51 \times 10^6 \text{ cells L}^{-1}$,接种后置于 LRH-250-GS 型人工光照气候箱(广东省医疗器械厂)中培养。培养温度 $20 \pm 1^\circ\text{C}$,光照强度为 $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$,光暗循环为 L:D = 12:12。每天固定时间取样于显微镜下计数,绘制藻细胞的生长曲线。根据公式 $\mu = (\ln N_2 - \ln N_1) / (t_2 - t_1)$ 计算比生长率,其中 t_1 、 t_2 为培养时间; N_1 和 N_2 分别为培养 t_1 、 t_2 时间的细胞密度。

1.3 溶血毒素的提取

取对数生长期末期的藻液,分批于 $2\ 000 \times g$ 离心 10 min 收集藻细胞,置于氯仿:甲醇:水 = 13:7:5(v/v)的混和溶液中;用 JY92-II 型超声波细胞破碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司)于 4°C 破碎 30 min。仪器参数设置为:功率 200 W,破碎时间 5 s,间隔时间 5 s;破碎后于分液漏斗中静置,待完全分层后取下层溶液,去除溶剂后溶解于适量的甲醇中(甲醇的量为培养液的 2/1000),即得到粗提的溶血毒素^[10]。

1.4 溶血活性的测定

以洋地黄皂甙为溶血毒素标准,柠檬酸缓冲液(pH 7.0)处理的 0.5% (v/v)的新鲜兔血红细胞为材料,绘制标准曲线^[2,11]。取 100 μL 待测毒素溶液,用柠檬酸等酸缓冲液补充至 400 μL ,再加入 0.5% 的红细胞溶液 1 600 μL 于 37°C 反应 30 min, $350 \times g$ 离心 5 min。取上清液用 Gold spectrumlab 53 紫外可见分光光度计(上海棱光技术有限公司)检测其吸光度值 $\text{OD}_{540\text{nm}}$ ^[2,12],计算溶血百分数^[13]。设不含毒素的甲醇作为对照。

1.5 不同因素对溶血活性的影响

1.5.1 不同温度条件下的溶血活性

反应体系:100 μL 毒素溶液,300 μL pH 值为 7 的柠檬酸等渗缓冲液和 0.5% 的红细胞溶液 1 600 μL (100 μL 甲醇为对照),于 0°C 、 4°C 、 20°C 和 37°C 下反应,每隔 10 min,检测其吸光值。每个温度测定 3 次,检测方法同上。

1.5.2 不同 pH 条件下的溶血活性

取 100 μL 毒素溶液,1 600 μL pH 值分别为 4、5、6、7、8 和 9 的 0.5% 的红细胞溶液和 300 μL 相应 pH 值的柠檬酸等渗缓冲液(100 μL 甲醇为对照),于 37°C 反应,每隔 10 min,测定吸光值。每个实验

测定3次,检测方法同上。

1.5.3 二价阳离子对溶血活性的影响

于红细胞悬浮液中分别加入一定量的 $MgCl_2$ 、 $CaCl_2$ 、 $MnCl_2$ 、 $CoCl_2$ 、 $ZnSO_4$ 、 $CuSO_4$ 和 $HgCl_2$, 使终浓度为 5 mmol/L。溶血活性的检测方法同上。

另外,实验中测定了不同浓度的 Hg^{2+} 对溶血作用的影响,以及 EDTA 对 $HgCl_2$ 抑制溶血作用的影响。加入毒素 20 min 后加入 1 mmol/L 的 $HgCl_2$, 继续反应 10 min, 然后加入 5 mmol/L 的 EDTA。观察其溶血活性的变化。

2 结果和讨论

2.1 米氏凯伦藻生长曲线

图1为米氏凯伦藻的生长曲线。可知,米氏凯伦藻经过2~3 d的延滞期后,细胞开始快速分裂,细胞数目呈对数增加,进入对数生长期。26 d后藻细胞衰亡的速度开始大于分裂的速度,总体细胞数目变少,进入衰亡期。在对数生长期米氏凯伦藻的比生长率 μ 平均为 $0.0495 d^{-1}$, 以第5天最高,达 $0.249 d^{-1}$, 比吕颂辉等^[14]以 NO_3-N 为氮源, $C_N/C_P = 16$ 时米氏凯伦藻的生长率小。这可能与实验中藻的初始密度、培养温度和光照等环境条件不同有关。

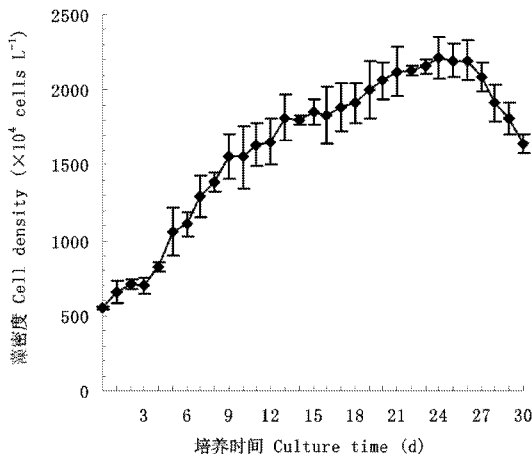


图1 米氏凯伦藻的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of *Karenia mikimotoi*

2.2 米氏凯伦藻溶血毒素的活性

米氏凯伦藻溶血活性为 $64.69 \pm 6.43 HU L^{-1}$, 单个细胞中的溶血活性为 $6.17 \pm 0.61 \times 10^6 HU$, 明显高于实验室培养的球形棕囊藻^[15]和何家苑野外采集的球形棕囊藻的溶血活性^[16]。这可能是造成米氏凯伦藻比球形棕囊藻鱼毒性更强、造成损失更大

的原因之一。

2.3 溶血反应特征

图2为温度对米氏凯伦藻溶血活性的影响。可以看出,随温度的升高,溶血活性逐渐增强。0℃时,随时间的延长,溶血活性基本维持不变,维持在10%左右;4℃、20℃和37℃时,溶血活性随时间的延长逐渐增加。这一结果与棕囊藻溶血毒素的相似^[2]。目前有关米氏凯伦藻溶血毒素的结构尚不十分清楚。但初步研究表明,其主要组分可能是糖脂和不饱和脂肪酸^[3-4]。其分子中含有一个亲水端和一条疏水链,类似于非离子型表面活性剂。非离子型表面活性剂的溶血活性与其临界胶态浓度(critical micelle concentration, CMC)成反比^[17]。随温度升高 CMC 降低^[18]。因此,可以认为米氏凯伦藻溶血活性随温度的变化与其非离子型表面活性剂的结构特性有关。

从海水四季的表层温度来看:在春、冬季,纬度比较高的海域,如渤海、黄海表层平均水温约10℃左右,且纬度越高,温度越低;而纬度比较低的海域,如东海、南海表层水温可大于20℃,且纬度越低,温度越高;夏季和秋季也存在这种情况,所不同的是都可以达到较高温度,如南部海域可以达到30℃左右。因此我们可以推测南海水域爆发米氏凯伦藻赤潮引起的危害可能大于其他海域。

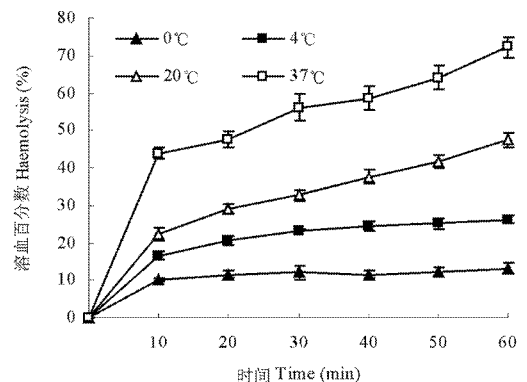


图2 温度对米氏凯伦藻溶血活性的影响

Fig. 2 The effects of temperature on hemolysis caused by

Karenia mikimotoi

从图3可以看出,不同pH条件下米氏凯伦藻溶血毒素的溶血活性明显不同,其中pH 6.0时的最高,pH 4.0时的最低,pH 5.0、7.0、8.0和9.0时比较接近。这与球形棕囊藻(*Phaeocystis globosa*)和小定鞭藻(*Prymnesium parvum*)的情况有差异,说明米

氏凯伦藻溶血毒素的亲水端与棕囊藻不同^[2,11]。一般来说,海水 pH 值在 8.0~9.0 左右;入海口,特别是有污染的入海口或港湾其 pH 值比较低,接近 6.0。因此,推测入海口发生米氏凯伦藻赤潮危害的可能更大。

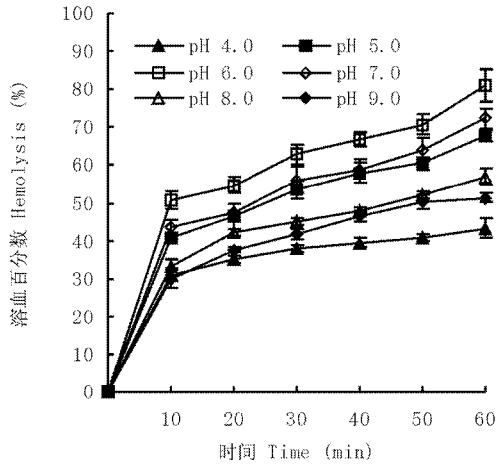


图 3 pH 值对米氏凯伦藻溶血活性的影响

Fig. 3 The effects of pH on hemolysis caused by *Karenia mikimotoi*

从图 4 可以看出,大部分二价阳离子抑制溶血毒素的溶血活性,其中 Hg^{2+} 的抑制作用最强,几乎可完全抑制其活性;其他离子的抑制作用大小为 $\text{Cu}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$ 。

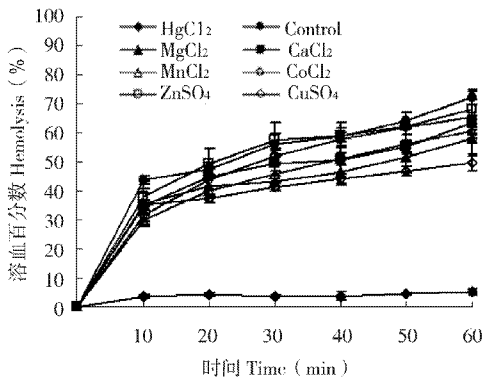


图 4 二价阳离子对米氏凯伦藻溶血活性的影响

Fig. 4 The effects of divalent cations on the hemolysis induced by *Karenia mikimotoi* extract

为进一步阐明 Hg^{2+} 抑制米氏凯伦藻溶血活性的机制,我们比较了不同浓度 Hg^{2+} 的溶血活性及 EDTA 的影响。从图 5 可以看出, $[\text{Hg}^{2+}] = 1 \text{ mmol/L}$ 时,溶血百分数几乎为 0; $[\text{Hg}^{2+}] = 5 \text{ mmol/L}$ 时,溶血百分数恒定为 0,此时红细胞已完全聚集沉淀。而 $[\text{Hg}^{2+}] = 0.1 \text{ mmol/L}$ 时,1 h 后溶血百分数为 42.23%;同时加入 100 μL 毒素和 0.1 mmol/L 的

Hg^{2+} , 37°C 反应 10 min 后,溶血百分数达 67.13%,这远远大于 100 μL 毒素的溶血百分数(42.98%),这表明低浓度的 Hg^{2+} 可以促进溶血。Zolla 等^[19] 研究汞离子对人血红细胞的影响时,也观察到这种现象,当 $[\text{Hg}^{2+}] > 0.25 \text{ mmol/L}$ 时,血红细胞开始产生快速的聚集反应,从而阻止了 Hg^{2+} 诱导的溶血反应; $0.1 \text{ mmol/L} < [\text{Hg}^{2+}] < 0.25 \text{ mmol/L}$ 时,可导致溶血反应。

从图 5 还可看出,加入 100 μL 毒素反应 20 min 后,溶血百分数接近 50%,此时加入 1 mmol/L 的 Hg^{2+} 反应 10 min,溶血百分数仍维持在 50% 左右,而对照组则增加到 56.71%,表明 1 mmol/L 的 Hg^{2+} 能够有效阻止正在进行的溶血反应。随后加入 5 mmol/L 的 EDTA,溶血百分数开始明显增加,60 min 时溶血百分数已达到 71.37%,表明 EDTA 能完全消除 Hg^{2+} 对溶血过程的抑制作用。彭喜春等^[10] 在研究球形棕囊藻溶血活性时也发现类似现象。

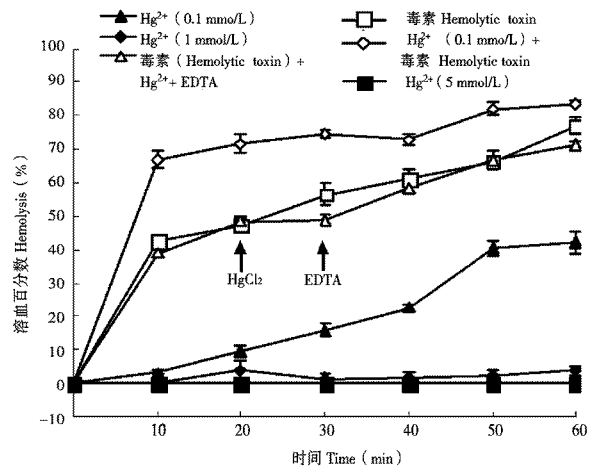


图 5 Hg^{2+} 对米氏凯伦藻溶血活性的影响

Fig. 5 The effect of Hg^{2+} on the hemolysis induced by *Karenia mikimotoi*

许多研究报道,不同双亲分子的溶血反应机制不同,大环内酯类抗生素能在生物膜表面形成离子通道,而皂甙类表面活性物质直接能与膜脂分子作用^[20]。高浓度的 Hg^{2+} 对米氏凯伦藻溶血活性具有强烈的抑制作用,几乎能完全抑制溶血反应,且能抑制正在进行的溶血反应。说明 1 mmol/L 的 Hg^{2+} 能够使兔血红细胞凝聚成团,这种凝聚作用使细胞膜的表面积大大缩小,不但阻止了 Hg^{2+} 进入血细胞诱导的溶血反应,而且阻止了毒素与细胞膜的大量结合。

综上所述,在 0°C~37°C 范围内,米氏凯伦藻溶血活性随着温度的升高而增强;pH 6.0 时米氏凯伦

藻溶血活性最强。不同的二价阳离子对米氏凯伦藻溶血活性的影响不同,当离子浓度为 5 mmol/L 时, Hg^{2+} 对其抑制作用最强。高浓度 Hg^{2+} 对红细胞的集合效应不但阻止了 Hg^{2+} 进入血细胞诱导的溶血作用,而且阻止了毒素对细胞膜的破坏,但这种抑制作用可被 EDTA 消除。

参考文献

- [1] Onji M, Nakano S, Suzuki S. Virus-like particles suppress growth of the red-tide-forming marine dinoflagellate *Gymnodinium mikimotoi* [J]. Marine Biotechnol, 2003, 5: 435-442.
- [2] Peng X C, Yang W D, Liu J S, et al. Characterization of the hemolytic properties of an extract from *Phaeocystis globosa* Scherffel [J]. J Integra Plant Biol, 2005, 47(2): 165-171.
- [3] Yamamoto C, Tanaka Y. Two species of harmful red tide plankton increased in Fukuoka Bay [J]. Bull Fukuoka Fish Exp, 1990, 16: 43-44.
- [4] Parrish C C, Bodennec G, Gentien P. Haemolytic glycoacylerolipids from *Gymnodinium* species [J]. Phytochemistry, 1997, 47(5): 783-787.
- [5] Wargo M J, Rizzo P J. Characterization of *Gymnodinium mikimotoi* nuclei and identification of the major histone-like protein, HGM [J]. Phycology, 2000, 36: 584-589.
- [6] Yasumoto T, Underdal B, Aune T, et al. Screening for hemolytic and ichthyotoxic components of *Chrysochromulina polylepis* and *Gyrodinium aureolum* from Norwegian coastal waters [M]// Graneli E, Sundstrom B, Edler L, et al. Toxic Marine Phytoplankton. New York: Elsevier, 1990: 436-440.
- [7] Gentien P, Lunven M, Lazure P, et al. Motility and autotoxicity in *Karenia mikimotoi* (Dinophyceae) [J]. Phil Tran Royal Soc B—Biol Sci, 2007, 362: 1937-1946.
- [8] Yamasaki Y, Kim D, Matsuyama Y, et al. Production of superoxide anion and hydrogen peroxide by the red tide dinoflagellate *Karenia mikimotoi* [J]. J Biosci Bioengin, 2004, 97(3): 212-215.
- [9] Wang Z H(王朝晖), Yin Y W(尹伊伟), Qi Y Z(齐雨藻), et al. Histopathological changes in fish gills during *Gymnodinium mikimotoi* red tide in Guishan Island area, the South China Sea [J]. Acta Oceanol Sin(海洋学报), 2001, 23(1): 133-138.(in Chinese)
- [10] Peng X C(彭喜春), Yang W D(杨维东), Liu J S(刘洁生), et al. Extraction of haemolytic substances from alga *Phaeocystis globosa* [J]. J Trop Subtrop Bot(热带亚热带植物学报), 2005, 13(1): 25-28.(in Chinese)
- [11] He J W(何家菴), Chen M H(陈明惠), He Z R(何振荣). Isolation and characterization of toxins from the phytoflagellate *Prymnesium parvum* [J]. Acta Hydrobiol Sin(水生生物学报), 1996, 20(1): 41-48.(in Chinese)
- [12] Liu J S(刘洁生), Xie J(谢瑾), Yang W D(杨维东). Studies on haemolytic toxins action in allelopathy of *Alexandrium tamarense* [J]. J Jinan Univ (Nat Sci) (暨南大学学报:自然科学版), 2007, 28(1): 105-107.(in Chinese)
- [13] Zhou C X(周成旭), Fu Y J(傅永静), Yan X J(严小军). Hemolytic activity studies of several harmful alga strains [J]. Asian J Ecotoxicol(生态毒理学报), 2007, 2(1): 78-82.(in Chinese)
- [14] Lü S H(吕颂辉), Huang K X(黄凯旋). The growth of *Karenia mikimotoi* Hansen in three different types of inorganic nitrogen sources [J]. Ecol Environ(生态环境), 2007, 16(5): 1337-1341.(in Chinese)
- [15] Liu J S(刘洁生), Peng X C(彭喜春), Yang W D(杨维东). Growth and hemolytic activities of *Phaeocystis globosa* Scherffel at different nutrients condition [J]. Acta Ecol Sin(生态学报), 2006, 26(3): 780-785.(in Chinese)
- [16] He J W(何家菴), Shi Z X(施之新), Zhang Y H(张银华), et al. Morphological characteristics and toxins of *Phaeocystis* cf. *pouchetii* (Prymnesiophyceae) [J]. Ocean Limnol Sin(海洋与湖泊), 1999, 30(2): 41-48.(in Chinese)
- [17] Moni R W, Parsons P G, Quinn R J, et al. Critical micelle concentration and hemolytic activity — A correlation suggested by the marine sterol, halistanol trisulfate [J]. Biochem Biophys Res Co, 1992, 182: 115-120.
- [18] Avelkano M I. Phospholipid solubilization during detergent extraction of rhodopsin from photoreceptor disk membranes [J]. Arch Biochem Biophys, 1995, 324(2): 331-343.
- [19] Zolla L, Lupidi G, Bellelli A, et al. Effect of mercuric ions on human erythrocytes. Relationships between hypotonic swelling and cell aggregation [J]. Biochim Biophys Acta, 1997, 1328: 237-238.
- [20] Liu J S(刘洁生), Peng X C(彭喜春), Yang W D(杨维东). AFM observation of hemolytic extracts from *Phaeocystis globosa* on rabbit erythrocytes [J]. J Trop Ocean(热带海洋学报), 2007, 26(2): 56-58.(in Chinese)