

亚历山大藻对海湾扇贝受精卵孵化的影响及致毒机制研究^{*}

陈桃英^{1, 2}, 颜 天¹, 刘利平¹, 王丽平¹, 周名江¹

(1 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;

2 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘 要: 研究了亚历山大藻对海湾扇贝受精卵孵化的影响及致毒机制。结果发现: 八株产 PSP 毒素的亚历山大藻和两株不产 PSP 毒素的相关亚历山大藻均显著抑制海湾扇贝受精卵的孵化, 说明这种抑制作用在亚历山大藻中具有一定的普遍性, 且与 PSP 毒素无直接关系; 一种 PSP 标准毒素 STX 也没有这种抑制作用, 进一步证明可能存在其他毒素。以相关亚历山大藻为对象展开进一步研究发现该藻对受精卵孵化的半数抑制密度 (ID₅₀) 为 1 000 个 · mL⁻¹; 其藻液、重悬液、去藻液、内容物和藻细胞碎片均显著影响受精卵的孵化; 研究还发现该藻能改变了担轮幼虫破坏细胞膜结构和胞内结构, 促使细胞内产生大量溶酶体, 但溶酶体的稳定性下降, 表明相关亚历山大藻可能通过影响海湾扇贝早期发育阶段的细胞结构和免疫功能而导致孵化失败。

关键词: 有害赤潮; 亚历山大藻; 海湾扇贝受精卵; 致毒机制

中图分类号: X55 X503.2 文献标识码: A 文章编号: 0529-6579 (2007) 02-0077-05

在形成有毒赤潮的藻种中, 甲藻亚历山大藻 (*Alexandrium* spp.) 是常见藻种。该藻有 20 多种, 不仅产生麻痹性贝毒 (Paralytic Shellfish Poisoning PSP) 毒素, 危害海洋生态系统的各个环节, 威胁人类健康^[1], 还产生其它毒性物质^[2-4]。本实验室以往研究发现塔玛亚历山大藻 *A. tamarense* ATHK 对栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 受精卵孵化的毒性与 PSP 毒素无关^[5]。本文以此为基础, 比较研究了 11 株亚历山大藻对海湾扇贝 (*Argopecten irradians*) 受精卵孵化的影响, 探讨这种毒性作用在亚历山大藻中的普遍性。为避免 PSP 毒素可能造成的影响, 还以一株不产 PSP 毒素的相关亚历山大藻 *A. affine* 为对象, 进一步研究对海湾扇贝受精卵孵化的影响和毒性来源, 并通过透射电镜观察了相关亚历山大藻对其早期发育过程中的重要阶段——担轮幼虫细胞结构的影响。溶酶体的稳定性与生物体的健康状况密切相关, 中性红保留时间 (Neutral Red Retention) 分析常作为检测溶酶体稳定性的一项灵敏的生物指标^[6-7]。本文也采用此方法研究相关亚历山大藻对海湾扇贝担轮幼虫溶酶体稳定性的影响, 以期从细胞结构和功能两方面探讨相关亚历山大藻抑制海湾扇贝受精卵孵化的机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

海湾扇贝亲贝 (壳高: 5.7 ~ 6.0 cm) 由青岛金瀛海洋科技发展公司提供。 *A. catenella* (ACDH) (高效液相色谱检测产 PSP 毒素) 分离自中国东海, 其它 10 株亚历山大藻同 Wang 等^[8], 藻均用 f2 培养液培养, 取指数生长期的藻实验。海水盐度为 $(31 \pm 1) \times 10^{-12}$ 。实验均在 $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$ 水浴中进行。

1.2 实验方法

采用温度刺激法诱导海湾扇贝排精产卵。除非特别说明, 实验均使用 50 mL 的小烧杯, 实验液体积为 30 mL, 受精卵密度为 50 个 · mL⁻¹。以海水和塔玛亚历山大藻 AT-6 为对照。每组设 3 个平行。将受精卵培养 36 h 后, 用鲁哥氏液固定, 于解剖镜下计数 D 型幼虫数, 采用以下公式计算

$$\text{孵化率} = \frac{\text{D型幼虫数}}{\text{总受精卵数}} \times 100\%。$$

1.2.1 11 株亚历山大藻对海湾扇贝受精卵孵化的影响 将塔玛亚历山大藻 (AT-6 ATHK, AT5-1, AT5-3 ATC102 ATC103), 链状亚历山大藻,

* 收稿日期: 2006-05-19

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向基金资助项目 (KZCX2-YW-208); 国家“973”项目资助项目 (2001CB409709); 国家自然科学基金资助项目 (20177023)

作者简介: 陈桃英 (1975 年生), 女, 博士, 现为上海水产大学生命学院讲师; 通讯联系人: 颜天;

E-mail: tianyan@ms.qdio.ac.cn

相关亚历山大藻 (AC-1, AS-1), *A. lusitanicum* 和微小亚历山大藻稀释至 $2\,000\text{个}\cdot\text{mL}^{-1}$, 另设 f/2 培养液组。

1.2.2 STX 标准毒素实验 一种 PSP 标准毒素 Saxitoxin (STX) 购于加拿大国立研究中心。参照塔玛亚历山大藻毒性 $1\,175.4\times 10^{-6}\mu\text{g}\text{个}^{-1}[9]$, 将标准毒素 STX ($2.94\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 稀释至相当于 $500\,1\,000$ 和 $5\,000\text{个}\cdot\text{mL}^{-1}$ 塔玛亚历山大藻的毒素浓度。

1.2.3 相关亚历山大藻 AC-1 影响实验 将相关亚历山大藻稀释至不同密度进行实验。半数抑制浓度定义为 50% 的受精卵能发育成 D 型幼虫的藻细胞密度。

1.2.4 相关亚历山大藻 AC-1 不同组分的影响实验 设 5 个组分: 藻液、重悬液、去藻液、内容物和藻细胞碎片进行实验, 组分的制备主要参考 Yan 等^[3] 方法, 各组分对应于 $3\,000\text{个}\cdot\text{mL}^{-1}$ 藻密度。

1.2.5 对担轮幼虫细胞结构的影响试验 将受精卵液置于 $2\,000\text{个}\cdot\text{mL}^{-1}$ 相关亚历山大藻液中培养 16 h 后 (发育成担轮幼虫), 用 $\varphi=2.5\%$ 戊二醛前固定, $w=1\%$ 锇酸后固定, 乙醇系列脱水, 环氧树脂 EPON812 包埋, LKB NOVA 型切片机超薄切片, 醋酸铀和柠檬酸铅双染色, 最后在加速电压为 75 kV 的 H-7000 (Hitachi Japan) 透射电镜下观察细胞结构。

1.2.6 对担轮幼虫溶酶体稳定性的影响实验 将受精卵置于不同密度的相关亚历山大藻液中培养 16 h 后, 浓缩幼虫, 重悬于 10 mL 海水中。中性红保留时间分析主要参考 Lowe 等^[7] 的方法: 吸取 $50\mu\text{L}$ 幼虫悬液于干净载玻片上, 滴加 $50\mu\text{L}\,8\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 中性红, 盖上盖玻片, 避光湿盒内孵育 15 min 后, 在光学显微镜下每 30 min 观察一次, 直至溶酶体颜色发生明显改变 (图 5B 所示) 的幼虫个数达 50% 左右, 记录该时间。每个样制 3 张片, 取平均值作为中性红保留时间。

1.3 统计分析

实验数据用 SigmaPlot 和 SPSS 软件分析, 所有数据用 ANOVA 进行统计差异分析, 以 $P<0.05$ 表示具有显著性差异。

2 结果

2.1 11 株亚历山大藻对海湾扇贝受精卵孵化的影响

从图 1 可以看出: f/2 培养液和塔玛亚历山大藻 AT-6 组的孵化率都达到了 80% 以上, 与对照组无显著区别 ($P>0.05$), 其它 10 株亚历山大藻

组的孵化率都不到 20%, 显著低于对照组 ($P<0.001$)。结果表明: 塔玛亚历山大藻 (ATHK, AT5-1, AT5-3, ATC102, ATC103), 链状亚历山大藻, 相关亚历山大藻 (AC-1, AS-1), *A. lusitanicum* 和微小亚历山大藻对海湾扇贝受精卵的孵化有强烈的抑制作用, 说明这种抑制作用在亚历山大藻中具有一定的普遍性。相关亚历山大藻对海湾扇贝受精卵孵化的影响与 PSP 毒素无关, 是其它非 PSP 毒素所引起的。

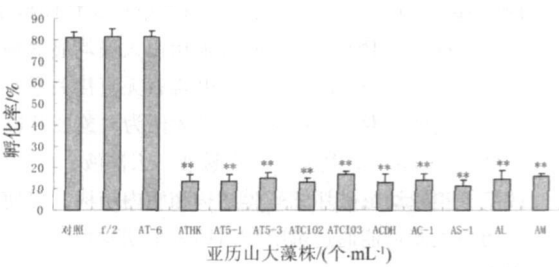


图 1 11 株亚历山大藻对海湾扇贝受精卵孵化影响
Fig. 1 Effects of 11 strains of *A. alexandrium* species on egg hatching success of *A. irradian*

2.2 STX 标准毒素对海湾扇贝受精卵孵化的影响

由图 2 可知: 不同浓度 STX 毒素组的孵化率都在 80% 左右, 与对照组没有显著差异 ($P>0.05$), 表明溶解的 STX 标准毒素对海湾扇贝受精卵的孵化没有抑制作用。

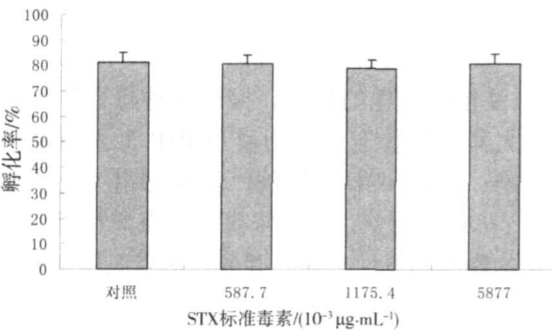


图 2 PSP 标准毒素 STX 对海湾扇贝受精卵孵化影响
Fig. 2 Effects of PSP toxins standard STX on egg hatching success of *A. irradian*

2.3 相关亚历山大藻对海湾扇贝受精卵孵化的影响

从图 3 可以看出: 随着藻密度增加, 海湾扇贝孵化率逐渐降低, 当密度为 $100\text{个}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 孵化率显著低于对照组 ($P<0.05$), 至 $3\,000\text{个}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 孵化率为 0, 其半数抑制密度 (IC50) 为 $1\,000\text{个}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

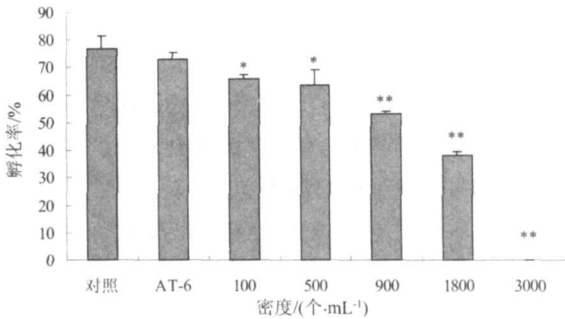


图 3 相关亚历山大藻对海湾扇贝受精卵孵化影响
Fig.3 Effects of *A. affine* on egg hatching success of *A. iradian*

2.4 相关亚历山大藻不同组分对海湾扇贝受精卵孵化的影响

从表 1 可以看出，相关亚历山大藻的 5 个组分均显著抑制海湾扇贝受精卵的孵化，其中藻液、重

悬液、内容物和去藻液组的孵化率为 0。
2.5 相关亚历山大藻 AC-1 对担轮幼虫细胞结构的影响

图 4 为相关亚历山大藻对海湾扇贝担轮幼虫细胞结构的影响。图 4A、B 为正常发育的担轮幼虫细胞结构，图 4C、D、E、F、G、H 为在藻液中发育的担轮幼虫细胞结构。从图中可以看出，在藻液中发育的担轮幼虫细胞中溶酶体数量显著增多，并聚集在细胞外周（图 4C、a 所示），有些溶酶体电子密度下降（图 4D、b）。细胞膜肿胀破裂，细胞内容物外溢，细胞内出现大量空洞（图 4E、c、d）；核膜也发生肿胀破裂（图 4E、i 所示）；染色质固缩，向核膜边集（图 4G、H、f、g）。相关亚历山大藻可能破坏了海湾扇贝早期发育阶段的细胞结构，导致受精卵孵化失败。

表 1 相关亚历山大藻不同组分对海湾扇贝受精卵孵化影响
Tab.1 Effects of different fraction of *A. affine* on egg hatching success of *A. iradian*

孵化率 %	对照	塔玛亚历山大藻 AT-6	不同组分 (3000 个 · mL ⁻¹)				
			藻液	重悬液	去藻液	内容物	碎片
76.6±4.7		72.8±2.6	0	0	0	0	32.2±4.1

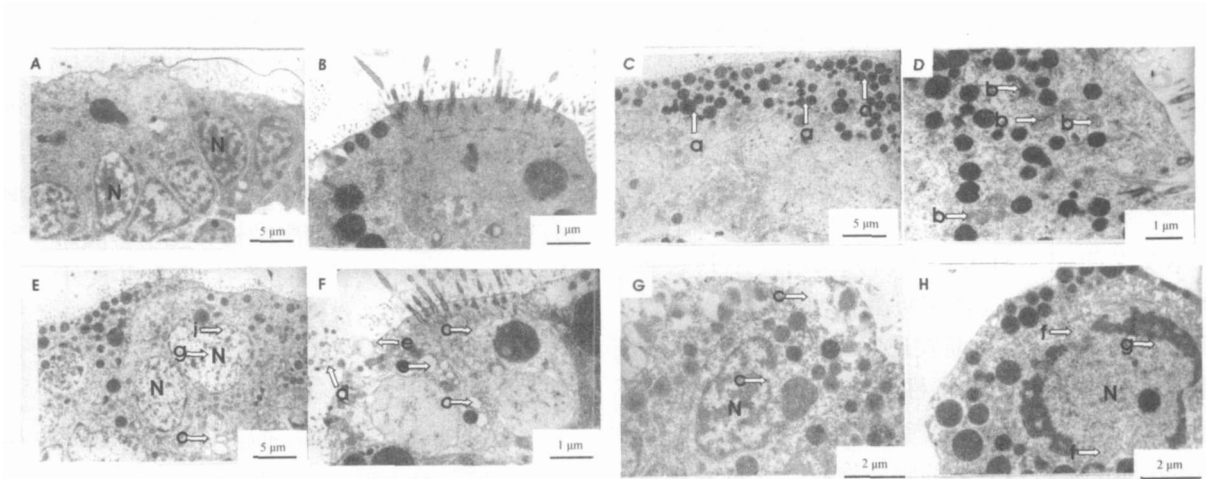


图 4 相关亚历山大藻对海湾扇贝担轮幼虫细胞结构的影响

Fig.4 Effects of *A. affine* AC-1 on ultrastructure of trochophore larvae of *A. iradian*
(N 细胞核；a 溶酶体；b 变性的溶酶体；c 细胞内空洞；d 胞内物质外溢；e 细胞膜破裂；f 核膜破裂；g 染色质固缩)

2.6 相关亚历山大藻 AC-1 对海湾扇贝担轮幼虫溶酶体稳定性的影响

从图 5 可以看出，随着时间延长，溶酶体发生破裂，红色逐渐变浅消失。

从图 6 可知，随着藻密度增加，溶酶体对中性

红的保留时间逐渐降低，达到 900 个 · mL⁻¹ 时，显著低于对照组 ($P<0.05$)。结果表明，相关亚历山大藻降低了海湾扇贝担轮幼虫溶酶体的稳定性，导致溶酶体容易破裂，从而降低了幼体的免疫能力。

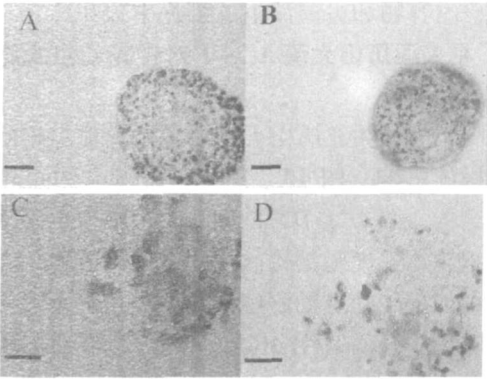


图 5 海湾扇贝担轮幼虫细胞溶酶体对中性红的保留过程 (bar= 20 μm)

Fig. 5 Retention process of lysosome of trochophore larvae of *A. irradian* on neutral red

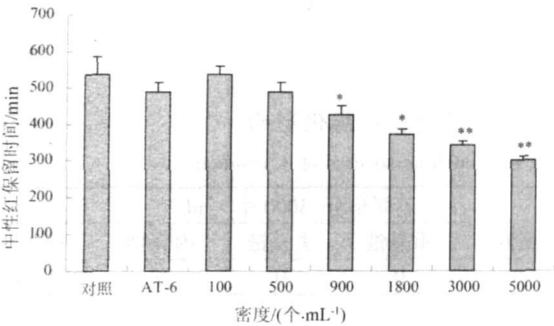


图 6 相关亚历山大藻 AC-1 对担轮幼虫溶酶体稳定性的影响

Fig. 6 Effects of *A. affine* AC-1 on lysosomal stability of trochophore larvae of *A. irradian*

3 讨论

本文结果表明有害亚历山大藻能产生其它非 PSP 的毒性物质抑制海湾扇贝受精卵的孵化。最近十多年来, 研究者们不断发现亚历山大藻属中的种类能产生其它非 PSP 的毒性物质。如塔玛亚历山大藻、微小亚历山大藻能产生溶血活性物质^[2 10], *A. taybri*能产生蛋白质类的胞外物质^[3]; 古老亚历山大藻 (*A. ostentellii*) 能产生螺环内酯毒素 (spionolides)^[11] 等等。不同亚历山大藻种产生的这些非 PSP 毒性物质似乎具有不同活性, 研究这些物质的结构特征、性质以及致毒机制将有助于全面了解有害亚历山大藻赤潮的危害途径、方式和机制。

相关亚历山大藻在日本、西班牙等地均引发过赤潮, 但该藻不产 PSP 毒素^[12], 仅越南发现的一株中检测到少量 PSP 毒素^[13]。本实验室以往的研究发现, 相关亚历山大藻 AC-1 和 AS-1 (即 *Alexandrium* sp. 1 和 *Alexandrium* sp. 2) 对褶皱臂尾轮虫 (*Brachionus plicatilis*) 的种群增长有显著抑

制作用^[8]。本文发现这两株藻对海湾扇贝受精卵的孵化有显著抑制作用 (见图 1)。相关亚历山大藻 AC-1 和塔玛亚历山大藻 ATHK 对受精卵孵化的毒性来源稍有不同: 相关亚历山大藻的各个组分对海湾扇贝受精卵的孵化均具有强烈抑制作用 (见表 1), 塔玛亚历山大藻主要是藻液、重悬液和藻细胞碎片对栉孔扇贝的受精卵孵化有显著抑制作用^[5]。产生这种差异可能有两方面原因: 一是不同亚历山大藻种可能具有不同的产毒特性; 二是不同贝类胚胎对有毒藻有不同的敏感性, 但需要在这方面展开进一步研究。相关亚历山大藻能分泌一些毒性物质于周围介质中, 可能对海洋生物的毒性作用会更直接、更大。

相关亚历山大藻能诱导海湾扇贝幼虫产生大量的溶酶体。溶酶体的功能之一是防御功能, 数量增多, 表明需要清除的外界异物较多。但相关亚历山大藻使溶酶体稳定性降低, 甚至使有些溶酶体变性, 这些意味着溶酶体清除能力降低。因此相关亚历山大藻会降低海湾扇贝担轮幼虫的免疫功能, 影响对不良环境的抵抗能力; 同时, 大量溶酶体的产生, 导致用于其它发育方面的能量减少, 这可能是该株亚历山大藻影响海湾扇贝受精卵孵化失败的又一原因。中性红保留时间主要是根据细胞中溶酶体对中性红保留时间的变化来推断生物个体免疫功能是否受影响^[6-7], 本文首次采用此方法直接研究个体中溶酶体对中性红保留时间的变化来反映扇贝幼体的健康水平, 也取得了比较明显的效果。

综上所述, 相关亚历山大藻可能通过影响海湾扇贝早期发育阶段的细胞结构和免疫功能而导致孵化失败, 亚历山大藻除了产生 PSP 毒素外, 还能产生一些非 PSP 的毒性物质危害海洋生物。

参考文献:

[1] LANDSBERG JH. The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms [J]. Reviews in Fisheries Science 2002 10(2): 113 - 390

[2] BAGØIEN E, M RANDE A, REGUERA B et al Effects of two paralytic shellfish toxin producing dinoflagellates on the pelagic harpacticoid copepod *Eutima aetifrons* [J]. Marine Biology 1996 126 (3): 361 - 369.

[3] EMURA A, MATSUYAMA Y, ODA T. Evidence for the production of a novel proteinaceous hemolytic exotoxin by dinoflagellate *Alexandrium tamarense* [J]. Harmful Algae 2004 3: 29 - 37.

[4] SMOMSEN S, MOLLER BL, LARSEN J et al Hemolytic activity of *Alexandrium tamarense* cells [C] // LASSUS B, et al eds Harmful Marine Algal Blooms Paris Lavoisier 1995 513 - 517

- [5] YAN T, ZHOU M, JI FU M, et al. Inhibition of egg hatching success and larvae survival of the scallop *Chlamys farreri* associated with exposure to cells and cell fragments of the dinoflagellate *Alexandrium tamarense*[J]. Toxicon, 2001, 39: 1239 – 1244.
- [6] MOORE M N. Cellular response to pollutants[J]. Marine Pollution Bulletin, 1985, 16: 134 – 139.
- [7] LOWE D M, FOSSATO V U, DEPLEDGE M H. Contaminant-induced lysosomal membrane damage in blood cells of mussels *Mytilus galloprovincialis* from the Venice Lagoon: an in vitro study[J]. Marine Ecology Progress Series, 1995, 129: 189 – 196.
- [8] WANG L, YAN T, YU R, et al. Experimental study on the impact of dinoflagellate *Alexandrium* species on populations of the rotifer *Brachionus plicatilis*[J]. Harmful Algae, 2005, 4: 371 – 382.
- [9] YU R, HUMMERT G, LUCKAS B, QIAN B, et al. A modified HPLC method for analysis of PSP toxins in algae and shellfish samples from China[J]. Chromatographia, 1998, 48(9/10): 671 – 677.
- [10] LUSH G J, NEGRI A, HALLEGRAEFF. Exotoxins produced by the toxic dinoflagellated *Alexandrium minutum* characterization by radioreceptor and neuroblastoma assays during the growth cycle [C] // HALLEGRAEFF G M, et al. eds. Harmful Algal Blooms 2000. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, 2001: 268 – 271.
- [11] JOHN U, QUILLIAM M A, MEDLIN L, et al. Spiroside production and photoperiod – dependent growth of the marine dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* [C] // HALLEGRAEFF G M, et al. eds. Harmful Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, 2001: 299 – 302.
- [12] MOTA M T, OLIVEIRA P B, MENDES J G, et al. Distribution of chlorophyll a and Gymnodinium catenatum associated with coastal upwelling plumes off central Portugal[J]. Acta Oecologica, 2003, 24: S125 – S132.
- [13] NGUYEN – NGOC L. An autecological study of the potentially toxic dinoflagellate *Alexandrium affine* isolated from Vietnamese waters[J]. Harmful Algae, 2004, 3: 117 – 129.

Impacts and Toxic Mechanism of Dinoflagellate *Alexandrium* Species on Egg hatching Success of *Argopecten irradians* Lamarck

CHEN Tao-ying^{1,2}, YAN Tian¹, LU Liping^{1,2}, WANG Liping^{1,2}, ZHOU Ming-jiang¹

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;

2. Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract The main aim of this study was to investigate toxic effect and mechanisms of *Alexandrium* species on eggs hatching success of *Argopecten irradians*. The results showed eight strains of PSP-producer *Alexandrium* species and two strains of non-PSP-producer *A. affine* had significantly detrimental effects, which indicated that it was a common feature of *Alexandrium* species that produced other than PSP toxins responsible for fertilized egg hatching failure. The dissolved PSP toxins standard saxitoxin (STX) had no such inhibition on egg hatching success, which further implied that fertilized egg hatching failure was not related to other non-PSP toxins. *A. affine* AC-1, which was non-PSP producer, was chosen to further study the detrimental effects on eggs hatching success of *A. irradians*. Results showed when exposed to 100 cells · mL⁻¹, hatching rates were lower significantly than that in control group. When exposed to 3000 cells · mL⁻¹, the hatching rate was 0, and the median inhibiting densities (ID₅₀) was 1000 cells · mL⁻¹. Algal culture re-suspended cells, free-cell medium, cell fragments and cell content of *A. affine* all had markedly adverse impacts. *A. affine* destroyed cellular ultrastructure of the trochophore larvae, damaged cellular membrane structure and cytoplasm structure, and induced a plenty of lysosome. Moreover, *A. affine* decreased lysosomal stability, made lysosome break easily, and damaged larval immune ability. It is thereby very likely that *A. affine* AC-1 had effects on cellular structure and function of *A. irradians* in early developmental stages to inhibit fertilized egg hatching of *A. irradians*.

Key words harmful algal blooms (HABs); *Alexandrium*; *Argopecten irradians* Lamarck; fertilized eggs hatching impact; toxic mechanisms