



# 贝类毒素监测的动物试验优化及替代方法

程树军<sup>1</sup>, 黄 韧<sup>2</sup>, 刘慧智<sup>1</sup>

(1. 广东出入境检验检疫技术中心食品实验室, 广州 510623; 2. 广东省实验动物监测所, 广州 510642)

**【摘要】** 贝类毒素严重威胁水产品的质量, 而且给人类健康带来潜在危害。由于其结构多样、作用机制复杂, 贝类毒素监控计划通常使用动物方法, 不仅成本高、定量难, 而且不符合“3R”的要求。运用减轻动物痛苦和减少数量的优化方法, 开发新的基于毒性作用机制和结构分析的细胞功能检测法、免疫学方法、化学分析法和生物传感器方法, 这些动物试验替代方法的研究提高了贝类毒素监测的有效性, 经过科学验证和认可后可用于监控目的。

**【关键词】** 贝类毒素; 动物实验; 替代方法

**【中图分类号】** R185; R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)02-0051-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.02.12

## Optimization of Animal Testing and Alternative Methods for Shellfish Toxin Monitoring

CHENG Shu-jun<sup>1</sup>, HUANG Ren<sup>2</sup>, LIU Hui-zhi<sup>1</sup>

(1. Food Lab of Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Technology Center, Guangzhou 510623, China;

2. Guangdong Laboratory Animal Monitoring Institute, Guangzhou 510620)

**【Abstract】 Objective** Shellfish toxins are not only threatening to quality of marine aquatic products but also become a potential threat to human health. As the structure diversity and function mechanism complexity, the monitoring programs of shellfish toxins using animal models are costly, difficult to quantitate and not meet 3R principles. There is a pressing need to develop new methods to reduce quantity of used animals and to relieve animal distress. Recently, many new assays based on action mechanisms have been developed including functional, immunological, chemical analysis and biosensor methods. These methods promote the efficacy of shellfish toxin monitoring and will be accepted by administration for regulation programs provided these approaches be scientifically validated and standardized.

**【Key words】** Shellfish toxin, monitoring; Animal test; Alternative method

贝类毒素, 也称海洋生物毒素, 主要由藻类或浮游植物产生, 蓄积于滤食性软体贝壳类动物的组织内, 例如蚌、扇贝、蛤蚌、牡蛎等, 不仅严重威胁水产养殖, 而且人类食用了受污染的贝类动物会带来严重的健康危害<sup>[1]</sup>。世界许多国家建立了贝类毒素监控计划, 多数推荐采用经典的动物试验, 这些方法存在明显的不足和局限, 而且不符合 3R 的原

则, 因而开发更加敏感、特异、快速和高通量的贝类毒素检测新技术已成为该领域的重点。

### 1 贝类毒素分类及基本毒性

根据贝类毒素的化学结构可分为 8 类, 分别是冈田软海绵酸(okadaic acid, OA), 扇贝毒素(pectenotoxin, PTX), 石房蛤毒素(saxitoxin, STX),

[基金项目] 广东省科技计划项目(2009B060300013)。

[作者简介] 程树军(1971), 男, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向: 动物试验替代方法及标准化。

原多甲藻酸 (azaspiracid, AZA), 短裸甲藻毒素 (brevetoxin, BTX), 环状亚胺 (cyclic imines), 软骨藻酸 (domoic acid, DA) 和虾夷扇贝毒素 (yessotoxin, YTX)。根据毒性作用机制可分为 4 类, 分别是腹泻性贝毒 (DSP)、麻痹性贝毒 (PSP)、神经性贝毒 (NSP) 和遗忘性贝毒 (ASP)。STX 及其衍生物属于麻痹类毒素, DA 属于遗忘毒素, 腹泻类贝类毒素包括 OA 和翅甲藻毒素 (DTX), AZA、PTX 和 YTX 属于亲脂毒素。

腹泻性贝毒 (DSP) 可分成三类: 聚醚类毒素 (如 OA 和 DTX)、大环聚醚内酯毒素 (如 PTX) 和融合聚醚毒素 (如 YTX)。DSP 毒素主要引起腹泻, 通常症状不严重, 对小鼠的半致死量为  $LD_{50}$  为  $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ , 但冈田软海绵酸 (OA) 是强烈的致癌因子。欧盟 2002/225/EC 对此类毒素设定了最高限量水平: 其中 OA/DTX 和 PTX 的总量不能超过  $160 \mu\text{g OA eq}/\text{kg}$ ; YTX 及其衍生物不能超过  $1 \text{ mg YTX eq}/\text{kg}$ ; AZA 不能超过  $160 \mu\text{g AZA eq}/\text{kg}$ 。麻痹性贝毒 (PSP) 大致分为三类: 氨基甲酸酯类毒素, 包括石房蛤毒素、新石房蛤毒素和膝沟藻毒素 (GTX1-4); N-磺酰氨基类毒素 (包括 GTX5、GTX6); 脱氨基类毒素 (包括 dcSTX、dcneoSTX、dcGTX1-4)。麻痹性贝毒主要作用是阻断细胞钠离子通道, 造成神经系统传输障碍而产生麻痹作用。PSP 的  $LD_{50}$  在  $(3 \sim 10) \times 10^{-9} \mu\text{g}/\text{kg}$  之间, 我国和欧盟均规定上市贝类麻痹性贝毒必须低于  $800 \mu\text{g}/\text{kg}$  贝肉, 相当于  $4 \text{ Mu}/\text{g}$ 。神经性贝毒 (NSP) 主要由短裸甲藻产生, 目前已分离多达 13 种毒素, 包括 BTX-A、B 和半短裸甲藻毒素 B (hemibrevetoxins B) 等。NSP 可以引起鱼类的大量死亡, 人类食用后产生以神经麻痹为主要特征的中毒症状。遗忘性贝毒 (ASP) 的主要成分是软骨藻酸, 它是一种强烈的神经毒性非蛋白氨基酸, 能导致短期记忆功能长久损害,  $LD_{50}$  为  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。2009 年, 欧盟提出 ASP 的允许含量水平为  $20 \text{ mg DA}/\text{kg}$ <sup>[2]</sup>。

## 2 贝类毒素监测的动物试验及优化方法

### 2.1 经典动物试验

1937 年 Sommer 等建立了监测 PSP 的小鼠生物法 (MBA 法), MBA 法是 AOAC 和欧盟指令 91/492/EEC 指定的检测方法, 并且已经使用了 50 多年, 检测限值近似  $40 \mu\text{g STXeq}/100 \text{ g}$  贝壳组织, 是目前最高残留限量的 (MRL) 50%。其原理是将待检样品

的酸性提取液直接进行小鼠腹腔内注射, 记录死亡时间, 如果  $< 5 \text{ min}$ , 则要稀释提取物直到死亡时间达到  $5 \sim 7 \text{ min}$ 。结果用“小鼠单位 (MU)”表示, 其定义是使一只  $20 \text{ g}$  重的小鼠在腹腔注射后  $15 \text{ min}$  内死亡的毒素含量即为一个鼠单位, 而  $1 \text{ Mu}$  的毒素含量相当于  $0.18 \text{ g}$  的 STX (石房蛤毒素), 可以通过乘以转换系数从小鼠单位 MU 转换到  $\mu\text{g STX}$  当量, 但由于不同品种的小鼠的敏感性不同, 这个数值会有波动, 实际应用中每个实验室应建立自己的  $\text{Mu}$  校正数值。

DSP 毒素的 MBA 检测法没有统一的方案, 前处理方式 (提取溶剂) 和检测样品 (整个生物体或肝胰脏) 对检测效果影响很大。小鼠生物法的最低检出限量是  $0.5 \text{ Mu}/\text{g}$ , 换算为 DSP 的毒力约为  $220 \mu\text{g}/\text{kg}$ , 报告结果需  $2 \text{ d}$  时间。每个试验选 3 只小鼠, 腹腔注射  $5 \text{ g HP-eq}$  或  $25 \text{ g WB-eq}$ , 如果有两只死亡可以判定阳性结果。大鼠生物鉴定法 (RBA) 也可以用来检测 DSP 中的 OA/DTXs 和 AZAs。

### 2.2 动物试验的优缺点

MBA 检测法相对快速、可靠, 在目前还有很多毒素结构未明和机制不清楚的情况下, 有可能根据动物出现的异常症状检测未知毒素 (如某些亲脂毒素) 的整体反应, 并且无需投入昂贵分析仪器。

动物试验也有明显缺点<sup>[3]</sup>: ①检测样品盐度较高干扰测定结果, 因而真实毒力水平可能被低估, 如对于 PSP 的检测, 实际毒素浓度范围可能是检测结果的  $1.5 \sim 2.5$  倍; ②检测结果存在实验室间偏倚, 而且无法自动化和高通量; ③实验需要大量高标准实验动物, 以死亡为终点, 给动物带来痛苦; ④由于锌的天然蓄积 (尤其是蚌) 可能对 PSP 的检测存在假阳性<sup>[3]</sup>; ⑤小鼠品系和性别可能对结果有影响; ⑥动物实验与人类的相关性备受质疑, 如对于 DSP 的检测, 动物实验是用 OA/DTXs 毒素对小鼠的腹腔注射毒性反映其对人的经口毒性关系, 不仅未考虑 OA/DTXs 等亲脂性毒素的其他作用途径和机制, 而且小鼠腹腔毒性与人的经口毒性可能不尽相同; ⑦MBA 方法检测亲脂毒素缺少专一性, 无法区别究竟哪一种毒素导致了毒性效应, 因而假阴性和假阳性都会发生。⑧对于 DSP 的动物实验方法, 不管是小鼠 MBA 和大鼠 RBA 试验均未经过验证, 欧洲标准委员会 (CEN) 也没有对贝类毒素检测的动物试验制定统一标准, 主要是以 Yasumoto 开发的 DSP 毒素检测方法为基础建立的, 但是即使不同实

实验室使用相同方案,也还有许多不同因子影响检测结果。而且 RBA 只能用于 OA 和 AZA 类毒素的检测<sup>[4]</sup>。

### 2.3 动物实验优化和减少

Dennison 开发了 PSP 试验的麻醉小鼠模型,试验过程中保持小鼠处于麻醉状态<sup>[5]</sup>,减轻了动物的痛苦,来自 STX 的检测数据表明麻醉可能会增加 PSP MBA 方法的灵敏度,比知觉模型可靠。

英国贝类毒素国家参考实验室建立了减少动物数量的方法,将标准规定的动物数量从 3 只减少到 2 只,因为从统计分析表明,只使用 2 只小鼠的实验可以为超过 99 % 的样品检测提供明确的结果。只有在试验出现 1 只小鼠死亡 1 只小鼠存活的情况下,才增加第 3 只小鼠用于确认。

Asp 建议去除 PSP MBA 方法中的稀释步骤使动物数量减少,作者认为没有必要将高浓度的毒素样品稀释,直到小鼠的存活时间在 5 ~ 7 min 范围内,因为 MBA 试验的目的是为了保护消费者免于 PSP 的伤害,纵使注射未稀释的高浓度毒素样品时会降低检测的精密性,但是只要注射的样品超过了动物的耐受水平,检测的精确性并不是那么重要<sup>[6]</sup>。

## 3 动物试验替代方法

### 3.1 细胞检测方法

细胞检测方法的原理是利用贝类毒素与敏感测试系统(细胞成份)的相互作用,通过检测细胞反应定量检测毒素水平,细胞检测法建立在对毒素作用机制充分认识的基础上。测试系统可以是细胞系统也可以是无细胞系统,但应含有识别毒素的靶分子结构。如石房蛤毒素(STX)和 BTX 可对 Na<sup>+</sup>通道产生抑制作用,根据这一原理,可以通过检测 STX 对毒毛花苷/藜芦预处理的神经母细胞瘤细胞的存活情况,也可以检测 STX 对藜芦预处理的神经母细胞瘤细胞中膜电位的变化<sup>[7]</sup>。可用直接比色法、荧光分析或膜电位染色,采用多孔细胞培养板进行高通量检测<sup>[8]</sup>。冈田酸(OA)类毒素可特异性抑制蛋白磷酸酶 2A (PP2A),利用这一机制可开发各种定量检测方法,检测极限可达 0.2 nmol/L,如采用直接比色、荧光分析和电化学检测等,测试系统可采用红细胞(PP2A 较敏感),也可采用无细胞的特异性酶底物(如对氨基苯基磷酸盐)。扇贝毒素(YTX)素对磷酸二酯酶(PDE)活性具有增强作用,

后者直接作用于环磷酸腺苷产生次级反应,基于此机制,建立了以培养的上皮细胞中 e-钙粘蛋白的测量为基础的 PDE 活性生物化学分析方法,采用多孔滴定板快速(1 h) 荧光分析技术,可应用于大量样品的筛选<sup>[9]</sup>。

### 3.2 免疫学方法

通过制备贝类毒素的抗体,然后检测抗体与化合物的特异性结合,利用这一免疫学原理可建立检测贝类毒素的系列试验,包括酶联免疫吸附试验(ELISA)、横向流动免疫测定(LFIA)和基于表面等离子体共振的生物传感器试验(SPR)。免疫学方法的使用可替代部分动物试验用于样品的初筛。因为通常只有在单一毒素存在并且其抗体特异性高的情况下,样品中毒素浓度的测量与它的毒性直接相关(如 DA 毒素的检测)。而在其它情况下,免疫学方法只能用于样品的筛选或定性方法,不能作为定量方法。

检测 ASP 可采用横向流动免疫色谱法(LFIC)、ELISA 法和 SPR 生物传感器技术。检测石房蛤毒素(STX)可采用抗体法和受体锚定法 2 种方法,其中侧向横流免疫色谱(LFIC)的标准化试剂盒已完成协作试验,有望通过 AOAC 的认可。采用这类 LFIC 试剂盒(如 MIST Alert™)检测 PSP,可以在不到 20 min 时间内得到 40 μg/100 g 的检测极限,非常方便现场试验和终产品检测。神经性贝毒(NSP)的检测目前已有 ELISA 方法检测短裸甲藻毒素,并被美国官方认可。

### 3.3 化学分析方法

以液相色谱(LC)分离原样或净提取物为基础,然后用物理化学方法进行特异性毒素检测,例如用紫外线(LC-UV)、荧光法(LC-FL)或质谱分析法(LC-MS)检测毒素,这样完全不使用动物就可实现毒素的定量检测。2007 年,采用超高压液相色谱(VHPLC)-MS/MS 检测法实现了仅用 6.6 min 分析 21 种亲脂类毒素<sup>[10]</sup>,借助于灵敏度不断提高的检测设备,更快速和高通量的检测方法有望不断建立。由于这些方法对化合物检测的特异性,化合物中单一物质的单独浓度的原始数据必须用转换因子转换成毒素当量。化学方法是目前欧盟等法规检测贝类毒素的定量分析方法(如 HPLC 检测 ASP),缺点是需要高纯度标准品,而对于大多数毒素,合成或提纯标准品非常困难。

### 3.4 生物传感器方法

在对毒素作用机制充分了解的基础上,以生物化学和传感技术为基础建立生物传感器方法,利用生物活性物质(如酶、抗体、抗原、细胞等)作识别元件,配以适当的物理或化学信号转换器所构成的分析工具。这项技术适用于贝类毒素的高通量的快速检测,如利用 OA 类毒素对蛋白磷酸酶 2A (PP2A) 产生特异性抑制作用的特点,Campas 等 2007 年开发了一种用于 OA 的电化学检测酶传感器,这种传感器建立在固定该毒素的 PP2A 酶的抑制作用和由酶引起脱磷酸化作用之后才具有电化学活性的酶基质的基础上<sup>[11]</sup>。使用石英晶体微天平(QCM)来测定 OA,采用直接竞争法结合化学发光检测技术以提高检测的灵敏度。对于神经性贝毒(NSP)检测的检测也有类似的方法,如利用 PbTx-3 对胞外动作电位的效应,开发神经网络生物传感器检测 PbTx-3,检测限在缓冲溶液中为 296 pg/mL,在稀释 25 倍的海水中为 430 pg/mL。

4 前景展望

近年来,以欧洲食品安全局为代表的机构投入

了大量资金用于贝类毒素检测方法的研发,许多具有前景的非整体动物的替代方法被提出或进入验证阶段(表 1)<sup>[3]</sup>。

目前欧洲标准委员会(CEN)完成标准化的贝类毒素分析方法主要是以液相色谱技术为基础的化学分析法,如检测贝类 DA 毒素的 LC-UV 方法,检测贝壳类 OA 毒素的前置柱衍生作用加荧光检测的 LC-FL 方法,检测贝壳类 STX 和 dc-STX 毒素的前置柱衍生作用加荧光检测的 LC-FL 方法,检测贝壳类 OA 毒素的有后置柱衍生作用加荧光检测的 LC-方法等。然而由于动物试验的准确性和差异性等方面的局限,虽然监管部门都将 MBA 方法列为监测计划的检测方法,但 CEN 没有对贝类毒素检测的动物试验制订统一标准。

显然,寻找替代动物试验的方法仍是贝类毒素监控检测技术研发的热点,虽然已有一些替代方法被推荐作为食品法典委员会的参照方法或被官方认可用于监管目的,但仍有许多问题需要解决,如大多数细胞检测法或化学分析法只能针对某一特定类别毒素的分析,使其应用范围受到一定限制;

表 1 贝类毒素监测的动物试验及替代方法  
Tab. 1 Animal testing and alternative methods for shellfish toxins monitoring

毒素类别 Biotoxin	动物实验 Animal testing	细胞检测方法 Cell assay	免疫学方法 Immunological assay	化学分析方法 Chemical analysis
原多甲藻酸 AZA	MBA/RBA	细胞形态 Cell morphology		LC-MS
短裸甲藻毒素 BTX	MBA	钠通道受体结合试验 Na-channel receptor binding assay; 神经母细胞瘤 Neuroblastoma	ELISA	LC-MS
环状亚胺 Cyclic Imines	MBA			LC-MS
软骨藻酸 DA	无 no	受体结合试验 Receptor binding assay	ELISA,免疫传感器 Immunobiosensor	LC-UV,LC-FL,LC-MS,TLC
冈田软海绵酸 OA	MBA/RBA	PP2A,PP1,F-actin	ELISA	LC-MS,LC-FL
腹泻性贝毒 PTX	MBA	F-actin		LC-MS,LC-FL,LC-UV, VHPLC-MSMS
石房蛤毒素 STX	MBA	钠通道受体结合试验 Na-channel receptor binding assay; 类转铁蛋白受体结合试验 Saxiphilin receptor binding assay; 神经母细胞瘤试验 Neuroblastoma	ELISA,LFIC,FIFLD	LC-FL,LC-MS
扇贝毒素 YTX	MBA	E-钙粘附分子片断 E-cadherin fragmentation; PDE-增强试验 PDE-enhancement	ELISA	LC-MS,LC-FL,VHPLC-MSMS

注:MBA:小鼠生物检测;RBA:大鼠生物检测;PP2A:蛋白磷酸酶 2A;PP1:蛋白磷酸酶 1;F-actin:丝状肌动蛋白;PDE:磷酸二酯酶;ELISA:酶联免疫吸附检测;LFIC:侧向横流免疫色谱;LC-FL:液相色谱-荧光检测;LC-MS:液相色谱-质谱检测;LC-UV:液相色谱-紫外吸收检测;TLC:薄层色谱分析;FIFLD:流动注射荧光检测;VHPLC-MSMS:超高压液相色谱质谱检测。  
Note:MBA: mouse bioassay; RBA: rat bioassay; PP2A: protein phosphatase 2A; PP1: protein phosphatase 1; F-actin: filamentous actin; PDE: phosphodiesterase; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; LFIC: lateral flow immuno-chromatography; LC-FL: liquid chromatography with fluorescence detection; LC-MS: liquid chromatography with mass spectrometric detection; LC-UV: liquid chromatography with ultraviolet absorption detection; TLC: thin layer chromatography; FIFLD: flow injection fluorescence detection. VHPLC-MSMS: very high presure liquid chromatography with mass spectrometric detection.

免疫学方法虽然能进行多样品的同时检测,但灵敏度和检测限还不能满足监控要求;替代方法的稳定性仍有待进一步验证,生物传感器方法中生物识别元件的再生及可重复利用问题并未得到根本解决<sup>[12]</sup>。随着贝类毒素作用机制的深入了解和检测技术的进步,在 3R 原则的推动下,很多替代动物实验的方法应用于海洋产品的质量检测和纳入生态环境监控计划是非常有前景的。

#### 参考文献:

- [1] Kumar KP, Kumar SP, Nair GA. Risk assessment of the amnesic shellfish poison, domoic acid, on animals and humans [J]. J Environ Biol. 2009, 30, 319–325.
- [2] Alexander J, Benford D, Boobis A, et al. Marine biotoxins in shellfish—domoic acid [J]. EFSA J. 2009, 1181, 1–61.
- [3] 程树军, 焦红. 实验动物替代方法原理与应用 [M]. 北京: 科学出版社, 2010: 544–554.
- [4] Gerssen A, Pol-Hofstad IE, Poelman M, et al. Marine toxins: chemistry, toxicity, occurrence and detection, with special reference to the Dutch situation [J]. Toxins 2010, 2, 878–904.
- [5] Dennison N, Zuur G, Petrie J, et al. Pilot investigation of the use of general anaesthesia to refine the statutory mouse bioassay for paralytic shellfish poison [M]. Fourth World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, 11–15 August 2002, New Orleans, LA, USA. 445–447.
- [6] Asp TN, Larsen S, Aune T. Analysis Of PSP toxins in Norwegian mussels by a post-column derivatization HPLC method [J]. Toxicon 2004, 43: 319–327.
- [7] Rossini GP. Functional assays in marine biotoxin detection [J]. Toxicology 2005, 207: 451–462.
- [8] Plakas SM, Dickey RW. Advances in monitoring and toxicity assessment of brevetoxins in molluscan shellfish [J]. Toxicon, 2010, 56: 137–149.
- [9] Fonfria ES, Viarino N, Vieytes MR, et al. Feasibility of using a surface plasmon resonance-based biosensor to detect and quantify yessotoxin [J]. Anal Chim Acta 2008, 1: 1–4.
- [10] Fux E, McMillan D, Bire R, et al. Development of an ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry method for the detection of lipophilic marine toxins [J]. J Chromatogr A, 2007, 1157(1–2): 273–280.
- [11] Campas M, Jean-Louis M. Enzyme sensor for the electrochemical detection of the marine toxin okadaic acid [J]. Anal Chim Acta, 2007, 605: 87–93.
- [12] 邹琴, 李刘冬, 陈培基, 等. 生物传感器在贝类毒素快速检测中的应用 [J]. 食品科学 2009, 30(7): 295–298.

修回日期) 2010-09-20