

# 水体中微囊藻毒素的污染状况和毒效应及其检测方法

沈菊芳 (上海市杨浦区疾病预防控制中心, 上海 200090)

当前,水体富营养化已成为全球性的环境问题。联合国环境规划署发布的《全球环境展望 2004 年年度报告》(GEO - Year book of 2004)表明,在其所调查的 66 个水域中,有 40% 正遭受中、重程度富营养化的影响。

近年来,我国各类水体都存在不同程度的富营养化问题,湖泊水库表现得尤为明显。据 1999 年对全国 130 余个湖泊的调查资料显示,高营养化湖泊占调查总数的 43.5%,中营养化湖泊占调查总数的 45.0%;在我国东南部经济发达地区的湖泊富营养化常伴随着藻类的疯长,而分布在城市和近郊的一些湖泊甚至达到了超营养化状态<sup>[1]</sup>。

在富营养化的水体中,藻类异常繁殖,形成水华。蓝藻水华是最常见的淡水水华,它们大多数是有毒的。而微囊藻毒素是一种在蓝藻水华污染中出现频率最高,产量最大和造成危害最为严重的藻毒素。微囊藻毒素是强的致肝癌物质,长期接触可引起肝癌。流行病学调查显示,在我国东南沿海一些地区如江苏启东、海门和广西绥远地区的原发性肝癌与饮用水源中微囊藻毒素的高本底含量密切相关<sup>[2-5]</sup>。微囊藻毒素与人类健康的关系问题已成为生命科学界、医学界和社会公众广泛关注的热点之一。为了减少微囊藻毒素对人类健康的影响,深入研究微囊藻毒素的结构特性,了解其在水体和水生生物中的污染状况以及毒效应是非常必要的。

## 1 微囊藻毒素的结构与理化性质

在水华蓝藻产生的毒素中,以铜绿微囊藻、鱼腥藻和颤藻等所产生的微囊藻毒素最为普遍。微囊藻毒素(microcystin - MCYST, MC)是一类具有生物活性的环状七肽化合物,由七个氨基酸构成的环状肽链分子(D - Ala - X - D - MeAsp - Z - Add - D - Glu - Mdha/Dha),其结构式如图 1。

其分子上 1 位是 Ala - 右旋 - 丙氨酸;2,4 位上的 X 和 Z 分别代表不同的氨基酸;3 位上是 MeAsp - D - 赤 - β - 甲基天冬氨酸;5 位上是 (2S,3S,8S,9S) - 3 - 氨基 - 9 - 甲氧基 - 2,6,8 - 3 甲基 - 10 - 苯基 - 4,6 - 二烯酸,简称 Adda;6 位上是 Glu - 异谷氨酸;7 位上是 Mdha - N - 甲基脱氢丙氨酸或 Dha - 脱氢丙氨酸。其中 Adda 是一种特殊的含 20 个碳原子的氨基酸,是微囊藻毒素生物活性表达所必需的基团。由于 MC 在 2,4 位上取代基 X、Z 的

作者简介:沈菊芳 (1959—),女,主管技师。

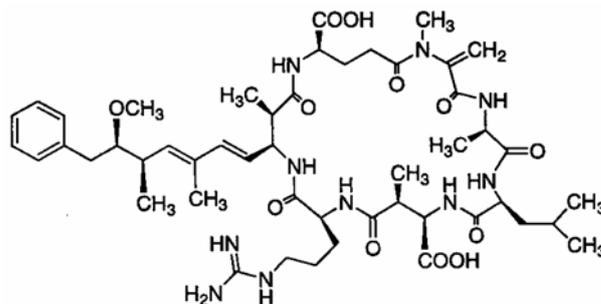


图 1 微囊藻毒素的结构式

不同,以及 3、7 位上 Asp 和 Dha 的甲基化和去甲基化就形成多种 MC 的异构体,其中 3 种主要微囊藻毒素异构体为 MC - LR、MC - RR、MC - YR。L、R、Y 分别代表亮氨酸、精氨酸和酪氨酸。世界上含量较多,分布较为广泛的是 MC - LR 和 MC - RR。在我国爆发水华的淡水湖泊中,往往会检测到 MC - LR 和 MC - RR。由于 MC - LR 存在较为普遍,产毒量较大,毒性较强,故现在在藻毒素研究上常以其为代表性指标,WHO 以 MC - LR 含量为基准推荐饮水藻毒素标准为 1.0 μg/L<sup>[6]</sup>。

微囊藻毒素具有环肽结构,化学性质较稳定。在实验室研究中,水库水中低浓度的 MC - LR (10 μg/L) 不到 1 周就可降解,在去离子水中超过 27 d 依然很稳定,自然水库中的不稳定性可能是由于生物降解的作用。Takenake 等<sup>[7]</sup>从湖泊表层水中分离出一种能够产生碱性蛋白酶的细菌 pseudomonas aeruginosa,它能够将水中的 MC 降解。张维昊等<sup>[8]</sup>的研究表明,由于微生物作用,溶液中的微囊藻毒素可以半衰期为 2.5 d 左右的速率降解。纯化的 MC 在阳光照射下依然是稳定的,当毒素暴露于波长在其吸收峰周围紫外线时,通过额外的异构化机制,更多的 MC - LR、MC - RR 被快速降解<sup>[9-10]</sup>。此外,MC 具有热稳定性,加热煮沸不易丧失毒性,在室温条件下干燥的 MC 可以保存数年之久<sup>[11]</sup>。由于毒素构型的变化使毒性的大小差异很大,如 MC - LR 的毒性大大高于 MC - RR。在自然条件下,温度和光照对构型的变化起着很重要的作用,如不同的季节,不同的水域甚至同一水域采集到同种微囊藻毒素的毒性会有很大的差异。

## 2 微囊藻毒素的产生机制

MC 是细胞内毒素,在细胞内合成,细胞破裂后释放出来并表现出毒性。由于它的环状结构及其氨基酸的特

殊结构,一般认为它不是由核糖体合成,而是由肽合成酶复合体合成的生物活性小肽。研究发现,MC在藻类的对数生长期中明显增加,毒素主要集中于细胞内部,对数生长末期达最大含量;停止生长后随着藻细胞的死亡解体,细胞内的水溶性毒素不断释放进入水体<sup>[12]</sup>。

MC产生的机制有很多学说,但到目前为止尚没有令人信服的结论,现在常提到的有遗传和环境因素。遗传影响学说的支持者认为,微囊藻有毒株(toxic strains)和无毒株(nontoxic strains)的毒性是由遗传决定的;环境影响学说认为MC的产生受微囊藻的生长期、光照、温度和营养条件的影响,生长条件改变,毒性也发生变化,环境因子通过作用于细胞分裂速度而控制毒素产生。MC的产生与否由基因决定,现已从铜绿微囊藻染色体中分离出了产生MC的DNA片段Mcy基因,同时发现凡能够产生藻毒素的藻种都含有Mcy基因,而不产生藻毒素的藻种有的也含有Mcy基因,说明基因的调控表达易受到外界条件影响而改变。

### 3 微囊藻毒素的污染状况

近10多年来,水体富营养化已成为一个全球关注的 environmental 问题。据联合国环境规划署(UNEP)的一项调查,在全球范围内30%~40%的湖泊和水库遭受了不同程度富营养化的影响。中国、美国、澳大利亚、德国、日本等20多个国家和地区都曾对其境内的淡水湖泊、水库等饮用水水源中的水华现象进行了报道,分离并检测出了主要毒素——微囊藻毒素。1993年Fastner等<sup>[13]</sup>对德国境内12个富营养化水体进行了调查,结果其中有9个检测出了MC。国外学者也相继报道了多起因微囊藻毒素污染导致人群、家畜、鱼类患病甚至死亡的事件。

近20年来,我国湖泊、水库和江河水体的富营养化发展速度也相当快,全国淡水水体富营养化状态日益严重,涉及范围不断扩大。在对长江、黄河、松花江等主要河流以及江西鄱阳湖、江苏太湖、安徽巢湖、武汉东湖、昆明滇池、上海淀山湖等几大淡水湖泊的调查中发现有大量藻类繁殖,并检测到了藻毒素的存在。产生的毒素主要是MC<sup>[14-17]</sup>,对人们饮用水的安全供给构成了越来越严重的威胁。

在我国许多地区是以湖泊、水库作为饮用水源,从饮用水源水和出厂水中检测出MC的报道也不少<sup>[18-21]</sup>,其中水源水中MC最高可达54 μg/L,而出厂水中最高达到2.7 μg/L,是目前WHO所建议的饮用水中MC浓度的2倍多。

微囊藻毒素不但污染水体而且可以污染水生生物。国外报道称长期暴露于微囊藻毒素的鱼类、虾蟹体内出现了微囊藻毒素的生物富集。在实验室的条件下,以浮游植物密度和微囊藻毒素的浓度为基础,经过40多个月

的观察分析,在水华前、水华及水华后等6个不同时间段,持续检测到鱼肝和肌肉中含有MC<sup>[22-23]</sup>。徐海滨等<sup>[24]</sup>对我国淡水湖泊MC污染水平和其在鱼体内的动态变化进行了研究,用ELISA方法测定鄱阳湖的水样及鱼样中微囊藻毒素浓度,结果显示各采样点鱼肌肉和肝脏中都检测出微囊藻毒素,进一步提示藻毒素可以在生物链中富集。

### 4 微囊藻毒素的毒效应

肝脏是MC主要的靶器官,急性中毒主要表现为肝脏肿大、淤血,肝体比重增加,肝脏细胞被破坏,肝脏出血坏死<sup>[21]</sup>。已有研究表明,MC是以肝脏为靶器官的多肽毒素,通过对鼠或鱼腹腔注射或经口给予毒素染毒,可以使动物在3h内迅速死亡,死亡前动物出现苍白和虚脱并伴有抽搐,解剖观察发现肝脏肿大,肝细胞小叶中心性坏死,肝细胞内有大量的红细胞,而其他部位呈缺血状态及出血性休克的结果。

MC对肝细胞影响的特点是细胞凋亡与活跃的细胞增殖相伴随。胡志坚等<sup>[25]</sup>建立MC促肝癌动物模型对MC的促癌作用进行了研究,结果显示,①MC可显著增加大鼠肝癌前指标γ-谷氨酰转肽酶(γ-GT)的阳性率;②MC可上调肝癌前病灶的主要凋亡抑制作用基因bc1-2的表达,同时可下调促细胞凋亡作用基因bax的表达。进一步证明MC有促癌作用,并且初步明确了调节与细胞凋亡相关的癌基因和抑癌基因表达可能是MC促癌过程的重要机制之一。MC作用于肝巨噬细胞,刺激细胞产生白细胞介素1(IL-1),IL-1再诱导产生可以引起急性炎症反应的物质,如前列腺素、血栓素及肿瘤坏死因子-δ(TNF-δ),这些物质导致了肝脏损伤和坏死,并引起炎症休克。此外一些实验还证实,MC是肿瘤促进剂<sup>[26]</sup>,对免疫功能产生明显的抑制作用<sup>[27]</sup>。

### 5 微囊藻毒素的检测

国内外对微囊藻毒素的检测方法目前可归结为3种:生物分析法、化学分析法和免疫学检测法。生物分析法是用动物急性毒性测定间接推算出MC的含量,一般无法准确定量。因此目前使用较多的是后2种方法。

化学分析方法包括高效液相色谱(HPLC)、质谱分析(MS)以及薄层色谱(TLC)等。液相色谱方法可与二极管阵列检测器(DAD)、紫外检测器(UV)或毛细管电泳(CE)等联用<sup>[28-31]</sup>,MS法成本较高,但灵敏度高;液质联用(LC/MS)快速而精确,即使没有标准毒素,在已知毒素相对分子质量情况下也可定性和定量检测;CE方法所需样品量少,采用激光诱导的荧光检测器能提高检测灵敏度。以上方法可用来对MC进行鉴别和定量,检出限可达几十到几百ng/L。这些方法分离效率高,分析时间短,样

品体积小,但是多数方法必须通过与标准样品的比对才能定性、定量且对检测仪器精密程度依赖程度高。

免疫学检测法包括酶联免疫分析(ELISA)及蛋白磷酸酯酶抑制分析(PPIA),应用此类分析方法筛选毒素的优点是灵敏度高,在处理大批样品时分析速度快,工作原理简单。在具备微囊藻毒素单克隆抗体、标准纯毒素和相关试剂的前提下,尤其是使用商品化的试剂盒时,ELISA方法是一种简单、高效、快速的方法。缺点是不能很好鉴别毒素,会出现假阳性反应。此外,微囊藻毒素的检测方法还有荧光探测、质谱法和细胞毒性监测技术等<sup>[32-34]</sup>。

微囊藻毒素的研究历史已久,亦取得了很多有价值的研究成果。但在MC的产生机制、致癌性的分子机制等方面尚有很多值得深入探讨的问题。研究MC的产生是受遗传控制还是环境因子左右,尚无定论。对于建立高效的藻毒素制备、提纯的方法,调查MC的污染状况以及慢性、亚慢性暴露所引起的危害,应予以足够的重视。未来对MC的进一步研究将集中于:① MC进入肝细胞的特殊传输机制的分子生物学研究,确证其是否为蛋白磷酸酯酶抑制剂;② 研究长期低浓度的MC对人体造成的危害,开展流行病学调查,提供淡水中MC的污染对人体健康影响的评价资料;③ 建立国际公认的能反映MC损伤的灵敏指标;④ 有必要建立一种简便、灵敏、定量准确的检测方法测定水体中微囊藻毒素的含量;尽快建立对饮用水中微囊藻毒素的常规检测方法,以确保人们日常饮水的安全和身体的健康。

## 6 参考文献

- [1] 国家环保总局. 1999年中国环境状况公报[J]. 环境保护, 2000, (6): 3-8.
- [2] 俞顺章, 赵宁, 资小林, 等. 饮用水与我国原发性肝癌关系的研究[J]. 中华肿瘤杂志, 2001, 23(2): 96-99.
- [3] 陈刚, 俞顺章, 卫国荣. 肝癌高发区不同饮用水类型中微囊藻毒素含量调查[J]. 中华预防医学, 1996, 30(1): 6-9.
- [4] 陈公超, 徐小英, 黄玉华. 海门农村饮用水与肝癌的初步研究[J]. 中国公共卫生学报, 1997, 16(1): 4-5.
- [5] 张明东, 俞顺章, 梁任详, 等. 广西扶绥县原发性肝癌病例对照研究[J]. 中华流行病学杂志, 1993, 14(1): 14-17.
- [6] WHO. Guideline for drinking-water quality. Second edition Addendum to Volum 2, Health Criteria and Other Supporting Information[M]. Geneva: World Health Organization, 1998: 95-110.
- [7] Takenaka S, Watanaba MF. Microcystin-LR degradation by *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease[J]. Chemosphere, 1997, 34(4): 749-757.
- [8] 张维昊, 宋立荣, 徐小清, 等. 天然水体中微囊藻毒素归宿的初步研究[J]. 长江流域资源与环境, 2004, 13(1): 84-88.
- [9] Tsuji K, Watanuki T, Kondo F, et al. Stability of microcystins from cyanobacteria - 11. Effect of UV light on decomposition and isomerization[J]. Toxicon, 1995, 33(12): 1619-1631.
- [10] Feitz AJ, Waite TD, Jones GJ, et al. Photocatalytic degradation of microcystin-LR: Conceptual model and scale studies[J]. Z Phys Chem (Muenchen), 1999, 213(1): 75-86.
- [11] Jones GJD, Falconer IR, Wilkins RM. Persistence of cyclic peptide toxins in dried *Microcystis aeruginosa* crusts from Lake Mokoan, Australia, Environ[J]. Toxicon Water, 1995, 81(4): 493-501.
- [12] Rapala J, Sivonen K, Lyra C, et al. Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxins, in *Anabaena* spp. as a function of growth stimuli[J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63(6): 2206-2212.
- [13] Fastner J, Codd GA, Jefferies TM, et al. Detection methods for cyanobacterial toxins[M]. London: The Royal Society of Chemistry, 1994.
- [14] 刘培启, 胡文容, 李力, 等. 水源水微囊藻毒素及其控制方法研究[J]. 环境与健康, 2003, 20(1): 56-58.
- [15] 刘建康. 东湖生态学[M]. 北京: 科学出版社, 1995: 395-402.
- [16] 王红兵, 宋伟民, 朱惠刚. 上海淀山湖, 黄浦江水系浮游藻类及藻类毒素动态研究[J]. 环境与健康, 1995, 12(5): 196-199.
- [17] 周伦, 鱼达, 余海, 等. 饮用水源中的微囊藻毒素与大肠癌发病的关系[J]. 中华预防医学, 2000, 34(4): 224-226.
- [18] 董传辉, 俞顺章, 陈刚, 等. 江苏几个地区与某湖周围水厂不同类型微囊藻毒素的调查[J]. 环境与健康, 1998, 15(3): 111-113.
- [19] 孟玉珍, 张丁, 王兴国, 等. 郑州市水源水藻类和藻类毒素污染调查[J]. 卫生研究, 1999, 28(2): 100-101.
- [20] 孙昌盛, 陈华, 薛常镐, 等. 同安水环境藻类及藻类毒素分布调查[J]. 中国公共卫生, 2000, 16(2): 147-148.
- [21] 吴静, 王玉鹏, 蒋颂辉, 等. 城市供水藻毒素污染水平动态研究[J]. 中国环境科学, 2001, 21(4): 322-325.
- [22] Magalhaes VFD, Soares RM, Azevedo SMFO, et al. Microcystin contamination in Ash from the Jacarepagua Lagoon (Rio de Janeiro Brazil): ecological implication and human health risk[J]. Toxicon, 2001, 39: 1077-1085.
- [23] 尹黎燕, 黄家权, 沈强, 等. 微囊藻毒素在沉水植物苦草中的积累[J]. 水生生物学报, 2004, 28(2): 151-154.
- [24] 徐海滨, 孙明, 隋海霞, 等. 江西鄱阳湖微囊藻毒素污染及其在鱼体内的动态研究[J]. 卫生研究, 2003, 32(3): 192-194.
- [25] 胡志坚, 陈华, 孙昌盛, 等. 微囊藻毒素促肝癌过程中肝细胞 *bcl-2* 及 *bax* 基因表达研究[J]. 中华预防医学, 2002, 36(4): 239-242.
- [26] Ito E, Kondo F, Terao K, et al. Neoplastic nodular formation in mouse liver induced by repeated intraperitoneal injections of microcystin-LR[J]. Toxcol, 1997, 35(9): 1453-1457.
- [27] 孙露, 沈萍萍, 周莹, 等. 太湖水华微囊藻毒素对小鼠免疫功能的影响[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2002, 16(3): 226-230.
- [28] Falconer IR. Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria[J]. Environmental Toxicology and Water Quality, 1991, (6): 177-184.
- [29] Falconer IR, Buckloy TR, Unnegar MTC. Biological half-life, organ distribution and excretion of <sup>125</sup>I labelled toxic peptide from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*[J]. American Journal of Biological Science, 1986, 39: 17-21.
- [30] Watanabe MF, Harada KI, Carmichael WW, et al. Toxic Microcystins[M]. Chemical Rubber Company Press, Boca Raton, FL, 1996: 103-148.
- [31] Jennifer LO, Wayne WC. LC/ESI/MS method development for the analysis of hepatotoxic cyclic peptide microcystins in animal tissue[J]. Toxi-

con, 2006, 47: 734 - 741.

[32] Chu FS, Huang X, Wei RD. Enzyme - linked immunosorbent assay for microcystins in blue - green algal blooms[J]. Anal Chem, 1990, 73: 451 - 456.

[33] Nagata S, Soutome H, Tsutsumi T, et al. Novel monoclonal antibodies against microcystin and their protective activity for hepatotoxicity[J]. Nat

Toxins, 1995, 3: 78 - 86.

[34] Nagata S, Tsutsumi T, Yoshida F, et al. A new type sandwich immunoassay for microcystin: production of monoclonal antibodies specific to the immune complex formed by microcystin and an anti - microcystin monoclonal antibody[J]. Nat Toxins, 1999, 7: 49 - 55.

(收稿日期: 2010 - 04 - 12)

文章编号: 1004 - 9231(2010)05 - 0266 - 02

· 卫生监督与管理 ·

# 医疗机构不良执业行为积分管理辦法的适用性分析

冯琼 (上海市卫生局卫生监督所, 上海 200050)

目前, 有关卫生法律法规执行成效的分析探讨有很多<sup>[1-2]</sup>, 总体上看, 这些探讨主要是针对法律法规在执行过程中所存在的问题, 分析原因并提出一些改进建议, 带有比较强的主观判断。2007年, 上海市卫生局颁布实施了《上海市医疗机构不良执业行为积分管理暂行办法》(简称《办法》), 本文拟通过对卫生监督部门和医疗机构的问卷调查, 采集相关数据, 对《办法》在实施过程中的适用性进行分析, 以便为进一步强化实施《办法》提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 资料

《办法》共分4章22条款, 其中条款6~11界定了43种违法行为, 并根据违法行为的严重程度, 设置了1~12分的不良执业行为记分分值; 条款13对医疗机构不良执业行为的认定与记分程序进行了规定。围绕上述条款的各项规定, 制定了调查问卷, 着重了解: 《办法》是否涵盖了实践中主要的、且行为后果严重或较严重的不良执业行为; 《办法》所列举的不良执业行为在实践中经常发生还是偶尔发生; 《办法》对不良执业行为的表述是否清晰; 《办法》对医疗机构不良执业行为的认定与记分程序是否具有可操作性; 《办法》对医疗机构不良执业行为的记分处理是否与不良执业行为后果的严重性相联系并有助于减少或杜绝不良执业行为的发生<sup>[3]</sup>。

向各级卫生监督部门和各类医疗机构发放调查问卷270份, 其中卫生监督部门100份, 医疗机构170份, 共回收问卷242份, 回收率为89.6%。

### 1.2 方法

① 系统性评价准则: 《办法》涵盖了主要的、且后果严重或较严重的不良执业行为。如果对“某项在实践中

属于主要的、且行为后果严重或较严重的不良执业行为已被《办法》所涵盖”的问卷认同率超过90%, 则《办法》关于该项不良执业行为相关规定的系统性评价结果为“达到要求”。

② 合理性评价准则: 《办法》对某项不良执业行为描述清晰。如果对“《办法》对某项不良执业行为描述清晰”的问卷认同率超过90%, 则《办法》关于该项不良执业行为相关规定的合理性评价结果为“达到要求”。

③ 可操作性评价准则: 《办法》规定的某项不良执业行为认定程序可行。如果“《办法》规定的某项不良执业行为认定程序可行或大部分可行”的问卷认同率超过90%, 则《办法》关于该项不良执业行为认定程序的可操作性评价结果为“达到要求”。

④ 成效性评价准则: 《办法》对某项不良执业行为的记分有助于今后避免再发生此类行为。如果对“《办法》对某项不良执业行为的记分有助于今后避免再发生此类行为”的问卷认同率超过90%, 则《办法》关于该项不良执业行为相关规定的成效性评价结果为“达到要求”。

## 2 结果

《办法》共界定了43种不良执业行为, 并针对这些不良执业行为, 分别制定了43项记分规定。基于卫监部门的实际操作性, 确立了4项不良执业行为认定程序, 其中1项程序同时与医疗机构相关, 故也对医疗机构做了问卷调查。对42种不良执业行为记分规定(略去定义宽泛的某种不良执业行为)的系统性、合理性、成效性及相关的4项认定程序的操作性的问卷调查结果见表1。

另外, 还对不良执业行为的发生频率进行了问卷调查, 结果见表2。

基金项目: 上海卫生监督科研项目(2009023)。  
作者简介: 冯琼(1970—), 女, 主治医师, 学士。