

# 镰刀菌毒素与黄曲霉菌毒素的联合毒性研究

## —DON、NIV 和 AFB<sub>1</sub> 的 UDS 试验

郭红卫 许洁 上海医科大学 (200032)

**摘要** 用非程序 DNA 合成(UDS)试验以研究镰刀菌毒素的脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)、雪腐镰刀菌烯醇(NIV)和黄曲霉毒素(AFB<sub>1</sub>)的联合毒性。结果表明,这三种毒素均可造成 DNA 损伤;DON 和 NIV 及 NIV 与 AFB<sub>1</sub> 对 DNA 损伤有交互作用,产生增毒影响。

**关键词** 致突变作用 联合作用 雪腐镰刀菌烯醇  
脱氧雪腐镰刀菌烯醇 黄曲霉毒素 非程序性 DNA

由于镰刀菌毒素和黄曲霉毒素都能污染粮谷类,故可能共存于同一粮食中。我们曾在同一粮食颗粒上检出了镰刀菌和黄曲霉菌,<sup>[8]</sup>以后又在玉米和小麦试样中同时检出了 DON、NIV、AFB<sub>1</sub>,其共同污染率玉米为 52.0%~59.2%,小麦为 14.0%。<sup>[9]</sup>国外也有类似的报道。<sup>[10]</sup>当这几种霉菌毒素同时进入机体后,其作用可相互影响,故应研究它们的联合毒性。为此,本文运用非程序 DNA 合成(UDS)试验对 DON、NIV 和 AFB<sub>1</sub> 的联合遗传毒性进行了研究。

### 1 材料和方法

#### 1.1 仪器和试剂

##### 1.1.1 大鼠离体肝脏灌流装置

1.1.2 Beckman 100 液体闪烁计数器(美国 Beckman 公司出品)

##### 1.1.3 多头细胞收集仪

##### 1.1.4 混合气体,含 95% O<sub>2</sub>,5% CO<sub>2</sub>

1.1.5 灌流液 由缓冲液 A、B 和 C 3 种组成,其组成成分分别如下:

缓冲液 A NaCl 8.0g, KCl 0.4g, MgSO<sub>2</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2g, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>O 0.06g, NaHCO<sub>3</sub> 2.19g, 加蒸馏水至 1000mL, 调 pH 值至 7.4。临用前加 0.5mmol/L 的乙二醇-双 2-氨基乙基醚四乙酸。

缓冲液 B 在缓冲液 A 的基础上加入 0.05% 的 I 型胶原酶(Sigma 公司)及 4mmol/L 的 Ca<sup>2+</sup>(每 100mL 加 CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.0588g), 并调 pH 值至 7.4。

缓冲液 C NaCl 6.9g, KCl 0.36g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.13g, NaHCO<sub>3</sub> 2.00g, MgSO<sub>2</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.295g, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.468g, 加蒸馏水至 1000mL, 调 pH 值至 7.4。临用前加入 1% 牛血清白蛋白。

1.1.6 Hanks 液 NaCl 8.00g, KCl 0.40g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.06g, NaHCO<sub>3</sub> 0.35g, MgSO<sub>2</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.20g, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.154g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 0.134g, 葡萄糖 1.00g, 酚红 0.02g, 加蒸馏水至 1000mL, 调 pH 值至 7.4。

1.1.7 培养液 DMEM 培养基, 青霉素 100 单位/mL, 链霉素 100μg/mL, 小牛血清 5%, 牛血清白蛋白 0.2%, 羟基脲 20mmol/L。

##### 1.1.8 I 型胶原酶 Sigma 公司。

#### 1.2 正交表的确定和试验浓度

选用 L<sub>18</sub>3<sup>7</sup> 正交设计表。以 DON、NIV 及 AFB<sub>1</sub> 对动物的 LD<sub>50</sub> 及细胞毒性, 确定它们的第一作用水平剂量分别为 0.3μg/mL, 0.1μg/mL 及 0.05μg/mL, 以此剂量连续稀释 10 倍, 分别得到第二及第三作用水平剂量的浓度(表 1、2)。

#### 1.3 UDS 试验方法

##### 1.3.1 肝细胞悬液的制备

选用体重为 180~250g SD 雄性大鼠(上海医科大学动物部, 动物合格证号为 23~57), 以大鼠离体肝脏灌流装置、混合气体、灌流液及 Hanks 液分离得肝细胞。用苔酚蓝试验测定所获得的肝细胞存活率 >90%。计数肝细胞浓度, 再用培养液稀释至浓度为 1×10<sup>6</sup>/mL 的肝细胞悬液。

##### 1.3.2 UDS 试验

先在每个小试管内装入 1mL 肝细胞悬液, 再加入试样液 5μL, 每个浓度做 3 个平行试样。以 DMSO 作空白对照、盐酸氮芥作为阳性对照。用多头细胞仪收集细胞, 用 Beckman LS<sub>3801</sub> 液体闪烁计数器测定放射性 CPM 值。

表1 L<sub>18</sub>3<sup>7</sup> 正交设计表

试验号	DON	NIV	DON + NIV	AFB <sub>1</sub>	DON + AFB <sub>1</sub>	NIV + AFB <sub>1</sub>	空列
1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	2	2	2	2	2	2
3	1	3	3	3	3	3	3
4	2	1	1	2	2	3	3
5	2	2	2	3	3	1	1
6	2	3	3	1	1	2	2
7	3	1	2	1	3	2	3
8	3	2	3	2	1	3	1
9	3	3	1	3	2	1	2
10	1	1	3	3	2	2	1
11	1	2	1	1	3	3	2
12	1	3	2	2	1	1	3
13	2	1	2	3	1	3	2
14	2	2	3	1	2	1	3
15	2	3	1	2	3	2	1
16	3	1	3	2	3	1	2
17	3	2	1	3	1	2	3
18	3	3	2	1	2	3	1

注:表中数字 1、2、3 分别为第一、第二和第三作用浓度

表2 DON、NIV 和 AFB<sub>1</sub> 的浓度  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 

	DON	NIV	AFB <sub>1</sub>
第一作用水平浓度	0.3	0.1	0.05
第二作用水平浓度	0.03	0.01	0.005
第三作用水平浓度	0.003	0.001	0.0005

### 1.3.3 结果判断依据

将 CPM 值进行平方根转化后作 Dunnett  $t$  检验以判断结果,当试样组与阴性对照组的 CPM 值比较有高度显著性差别 ( $P < 0.01$ ) 或有显著性差别 ( $P < 0.05$ ) 时,判断为阳性。并根据下式求出 DNA 放射比活性 R 值。

$$R \text{ 值} = \frac{\text{实验组 CPM}}{\text{阴性对照组 CPM}}$$

正交试验设计方差分析按《医用统计方法》<sup>[11]</sup> 进行。

## 2 结果

实验结果见表 3。统计分析表明 DON、NIV 和 AFB<sub>1</sub> 单独的及 DON 与 NIV, NIV 与 AFB<sub>1</sub> 对 UDS 试验交互作用的 CPM 值的影响有统计意义。DON 和 NIV 对 DNA 损伤的单独作用在第二作用水平时高于第一作用水平,可能与第一作用水平的浓度有一定的细胞毒作用有关。AFB<sub>1</sub> 的作用在第一和第二作用水平时相似,但在第三作用水平时降低。DON 和 NIV 的联合作用以两者均为第二作用水平时最高, DON 第一作用水平时, NIV 第三作用水平时最低(表 4)。NIV 与 AFB<sub>1</sub> 的联合作用以 AFB<sub>1</sub> 为第一作用水平, NIV 为第二作用水平时最高,两者都为第三水平时最低(表 5)。

## 3 讨论

程序外 DNA 合成是指 S 期外的 DNA 合成。在正常情况下,细胞内 DNA 合成见于细胞分裂周期的 S 期,而当 DNA 受外来物损伤时,在非 S 期也会进行以切除修复为主的修复合成。在这一过程中如出现

错误,就可引起基因突变。因此,根据这一原理可以在 DNA 水平上检测化学物质的损伤作用。分析了几百种化合物的测定结果,表明该方法与 Ames 试验有很好的相关性。所以 UDS 试验是筛选化学性致突变物和致癌物的有效方法之一。

表 3 DON、NIV 和 AFB<sub>1</sub> 的实验结果

		作用水平			
		I	II	III	P
阴性对照	CPM	1802			
	R 值	1.0			
DON	CPM	3499	5615	4700	<0.01
	R 值	1.9	3.1	2.6	
NIV	CPM	3850	5884	3818	<0.01
	R 值	2.1	3.3	2.1	
AFB <sub>1</sub>	CPM	6539	6450	3850	<0.01
	R 值	3.6	3.6	2.1	
DON + NIV	CPM	5622	5098	4835	<0.01
	R 值	3.1	2.8	2.7	
DON + AFB <sub>1</sub>	CPM	4621	4466	4729	>0.05
	R 值	2.6	2.5	2.6	
NIV + AFB <sub>1</sub>	CPM	5212	3642	4961	<0.01
	R 值	2.9	2.0	2.8	
阳性对照	CPM	7109			
	R 值	3.9			

表 4 DON 和 NIV 联合作用时的 CPM 值

		NIV		
		I	II	III
DON	I	2921	4810	2766
	II	4432	8402	4012
	III	4989	4438	4676

AFB<sub>1</sub> 是已知的动物致癌剂,在以往的研究中表明亦具有致突变性。DON 的致突变性报道则不一致,有的其 Ames 试验结果为阳性。<sup>[12]</sup>本次研究结果表明 DON、NIV 和 AFB<sub>1</sub> 均可造成 DNA 的损伤,DON 和 NIV 对 DNA 损伤的单独作用在第二作用水平时高于第一作用水平,可能是第一作用水平的浓度有一定的细胞毒作用所致。这两种毒素同属单端孢霉烯

族类,其毒作用相似,本次试验结果也如此。AFB<sub>1</sub> 的作用在第一和第二作用水平时相似,但在第三水平时降低。当 AFB<sub>1</sub> 为第一作用水平,NIV 为第二作用水平时,它们对 DNA 的损伤作用最强,而两者都处在第三作用水平时为阴性(表 5)。这些结果提示,多种霉菌毒素在同一粮食中共存,其交互作用可产生一定的增毒影响,故对霉菌毒素间的相互作用问题应引起重视。

表 5 DON 和 AFB<sub>1</sub> 联合作用时的 CPM 值

		AFB <sub>1</sub>		
		I	II	III
NIV	I	4374	3183	4785
	II	9622	3238	4791
	III	5620	3859	1976

#### 4 参考文献

- 徐达道. 赤霉病麦中毒研究. 微生物学通讯, 1982, 9(2): 79
- Schoental R. Trichothecenes, zearalene, and other carcinogenic metabolites of *Fusarium* and related microfungi. In Kelen, J, Weinhouse, S(Eds): advances in cancer research, Academic: London, 1985, 45: 217~290
- Ueno, Y, et al. Toxicological approaches to the metabolites of *Fusaria* III. Acute toxicity of fusarenone-x, Japan J Exp Med, 1971, 41: 521~539
- Saito M. Trichothecene toxins of *Fusarium* species. In I F H Purchase(ed): Mycotoxins, Elsevier. Amsterdam - Oxford - New York: 1974, 263~281.
- Sato N. Toxicological approaches to the metabolites of *Fusaria* VIII. Hematological changes in mice by a single and repeated administrations of trichothecenes. J Toxicol Sci, 1978, 3: 335~356
- Yu Shunzhang, et al. The aflatoxins and contaminated waters in the etiological study of primary liver cancer. In S Natori(ed): Mycotoxins and phycotoxins' 88, Amsterdam: Elsevier, 1989, 39~44
- 郭红卫,等. 膳食营养与原发性肝癌关系探讨. 中华预防医学杂志, 1991, 25(6): 342~344
- 郭红卫,等. 河南产麦区小麦镰刀菌毒素污染状况及农民摄入量. 中国食品卫生杂志, 1989, 1(2): 20~24
- 郭红卫,等. 粮食中黄曲霉毒素和镰刀菌毒素共同污染的调查. 中国食品卫生杂志, 1992, 4(4): 57~59

[下接第 45 页]