

## 研究报告

## 毒蕈条盖盔孢伞对小鼠毒性作用研究

刘泳廷<sup>1</sup>, 刘佳<sup>1</sup>, 叶建方<sup>1</sup>, 李磊<sup>1</sup>, 李海蛟<sup>2</sup>, 周亚娟<sup>1</sup>

(1. 贵州省疾病预防控制中心, 贵州 贵阳 550004;

2. 中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所, 北京 100050)

**摘要:**目的 研究条盖盔孢伞对小鼠的毒性作用。方法 采用经鉴定为条盖盔孢伞(*Galerina sulciceps*)的毒蕈, 含 $\alpha$ -鹅膏毒肽( $\alpha$ -AMA)为1 690  $\mu\text{g/g}$ 。小鼠设定464、215、100、46.4 mg/kg BW 4个剂量组, 腹腔注射, 取心、肝、脾、肺、肾、脑、肠进行病理学诊断检查。结果 雌性小鼠半数致死量(LD<sub>50</sub>)为108 mg/kg BW(可信限: 74.1~157 mg/kg BW), 小鼠肝脏病理显示随剂量的增加, 肝细胞肿胀、坏死, 伴有出血和炎细胞浸润的病变逐渐加重。结论 条盖盔孢伞主要含有 $\alpha$ -鹅膏毒肽, 对动物及人可造成肝脏损害。研究条盖盔孢伞的毒性作用机制, 对提高中毒者的生存率具有重要意义。

**关键词:**条盖盔孢伞; 小鼠; 毒性作用

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2021)03-0264-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2021.03.004

Study on the toxicity of *Galerina sulciceps* on miceLIU Yongting<sup>1</sup>, LIU Jia<sup>1</sup>, YE Jianfang<sup>1</sup>, LI Lei<sup>1</sup>, LI Haijiao<sup>2</sup>, ZHOU Yajuan<sup>1</sup>

(1. Guizhou Provincial Center for Disease Control and Prevention, Guizhou Guiyang 550004,

China; 2. National Institute Occupational Health and Poison Control, Chinese Center

for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China)

**Abstract: Objective** To study the toxic effects of *Galerina sulciceps* on mice. **Methods** The poisonous mushrooms collected from food poisoning were identified as *Galerina sulciceps*. The detected  $\alpha$ -amanodexin peptide ( $\alpha$ -AMA) was 1 690  $\mu\text{g/g}$ . The mice were designed into 4 dose groups of 464, 215, 100, 46.4 mg/kg BW. After intraperitoneal injection, heart, liver, spleen, lung, kidney, brain, and intestine of mice were taken for pathological diagnosis. **Results** In animal experiments, the median lethal dose (LD<sub>50</sub>) of female mice was 108 mg/kg BW (confidence limit: 74.1-157 mg/kg BW). The pathology of the liver of mice showed that with the increase of dose, hepatocyte swelling and necrosis, accompanied by bleeding and inflammatory cell infiltration, the pathological changes gradually worsened. **Conclusion** *Galerina sulciceps* mainly contains  $\alpha$ -AMA, which causes liver damage to humans and animals. Studying the toxic mechanism of *Galerina sulciceps* has great significance to improve the survival rate of poisoned patients.

**Key words:** *Galerina sulciceps*; mice; toxic effect

我国蘑菇资源丰富,由于一些野生可食蘑菇与有毒蘑菇在形态上很相似,采食野生蘑菇容易造成误食中毒。野生盔孢伞属分布较广,记载约有250种<sup>[1]</sup>,常见生长于腐木或落地枯枝丛中,部分种类有毒,毒素主要为鹅膏毒素。《中国毒蘑菇名录》<sup>[2]</sup>按拉丁名称属种字母顺序排列,收录了中国毒蘑菇435种,条盖盔孢伞(*Galerina sulciceps*)也被收录其

中,隶属于伞菌目、球盖菇科、盔孢伞属,但是条盖盔孢伞的毒性作用研究尚有不足。2019年12月贵州遵义仁怀市发生了一起误食条盖盔孢伞毒蘑菇中毒事件,本研究收集现场采集的条盖盔孢伞样品,测定其鹅膏毒素含量后,进行小鼠毒作用试验研究,并结合流行病学调查报告中报道的中毒患者血清学指标,综合研究分析条盖盔孢伞的生物学毒性特征。

收稿日期:2020-12-17

基金项目:贵州省科技厅科学技术项目(黔科合基础[2017]1095)

作者简介:刘泳廷 女 副主任医师 研究方向为卫生毒理学

E-mail:735161392@qq.com

通信作者:刘佳 女 主任技师 研究方向为卫生毒理学

E-mail:359348964@qq.com

## 1 材料与方法

## 1.1 材料

## 1.1.1 样品收集

食物中毒现场采集野生菌标本(标本号:GZ

20191207-01-03,凭证标本保存于中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所有毒生物标本馆),北纬:27°39'23",东经:106°7'55",海拔:814 m。标本经形态学和分子生物学(对标本转录间隔区序列扩增、测序,在 GenBank 中进行 Blast 比对)鉴定为条盖盔孢伞,并将序列提交到 GenBank 中(GenBank 号:MW228083)。采集的鲜品经 37 °C 烘箱烘干得到干品。

### 1.1.2 实验动物及饲养环境

昆明种雌性小鼠 25 只,体质量 18~22 g,由贵州医科大实验动物中心提供[许可证号:SCXK(黔)2018-0001,实验动物质量合格证号:1202303];小鼠饲料由四川省医学科学院四川省人民医院实验动物研究所提供[许可证号:SCXK(川)2015-01];饲养于贵州省疾病预防控制中心 SPF 实验动物环境[使用许可证号:SYXK(黔)2020-0001],温度 20 °C~25 °C,湿度 40%~70%。

### 1.1.3 主要仪器与试剂

RM2255 全自动轮转式切片机、ASP200S 全密封式组织脱水机均购自德国莱卡, NanoZoomer S360 数字病理切片扫描仪(日本滨松光子学株式会社), TSQ Quantum Ultra 三重四极杆串联-质谱仪(配置电喷雾离子源)、U3000 超高效液相色谱仪均购自美国 Thermo Fisher, BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm, 美国 Waters)。

甲醇(色谱纯),氨水(优级纯)。α-鹅膏毒肽(α-AMA)、β-鹅膏毒肽(β-AMA)、γ-鹅膏毒肽(γ-AMA)、二羟基鬼笔毒肽(PHD)、羧基二羟基鬼笔毒肽(PCD)、羧基二羟基鬼笔毒肽(PSC)标准溶液,浓度均为 50 μg/mL,均购自福州勤鹏生物科技有限公司。分别吸取 6 种标准溶液 1.00 mL 于 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度,即得浓度为 5 μg/mL 的混合标准溶液,-18 °C 冰箱保存,备用。

## 1.2 方法

### 1.2.1 动物试验

称取蘑菇干品 6 g,加 200 mL 蒸馏水电热板 300 °C 煮沸后转 200 °C 煮 1 h,过滤,同法提取 2 次,合并提取液在 90 °C 浓缩成浸膏状,用生理盐水定容至 15 mL,过滤除菌后备用(相当于 450 mg 干品/mL)。临用时用无菌生理盐水配制到所需浓度。

根据小鼠预试验结果,设定条盖盔孢伞 464、215、100、46.4 mg/kg BW 4 个剂量组,另设不给予受试物的空白对照组。取雌性昆明种小鼠 20 只,体质量 18~22 g,按体质量随机分为 5 组,每组 5 只。

腹腔注射(注射量为 10 mL/kg BW),密切观察毒性反应,记录每组小鼠死亡时间及死亡数量,对濒死小鼠取心、肝、脾、肺、肾、脑、肠等组织器官,福尔马林固定,进行病理学诊断检查。动物试验经过贵州省疾病预防控制中心伦理委员会审批,动物试验伦理审批件编号:S2020-02。

### 1.2.2 蘑菇毒素检测<sup>[3-4]</sup>

#### 1.2.2.1 样品前处理

称取 67 mg 蘑菇干粉于 50 mL 聚丙烯刻度离心管中,加入 25 mL 甲醇-水溶液(V/V,20:80),涡旋混匀,超声提取 30 min,10 000 r/min 离心 5 min(离心半径 6 cm),过膜 0.22 μm 的微孔滤膜,进样分析。出峰时间:β-鹅膏毒肽为 4.20 min,α-鹅膏毒肽为 5.02 min,γ-鹅膏毒肽为 5.57 min,羧基三羟基鬼笔毒肽为 5.68 min,羧基二羟基鬼笔毒肽为 6.01 min,二羟基鬼笔毒肽为 7.39 min。

#### 1.2.2.2 仪器条件

色谱:BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm),柱箱温度 35 °C,流动相 A 为甲醇,B 为 0.05% 氨水溶液;流速 0.25 mL/min,进样体积 10 μL。梯度洗脱条件见表 1。

表 1 梯度洗脱条件

t/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0.0	10	90
1.0	10	90
9.5	90	10
10.5	10	90

质谱:电喷雾离子源正离子模式(ESI<sup>+</sup>),喷雾电压 3 600 V,离子源温度 300 °C,脱溶剂温度:330 °C,鞘气(N<sub>2</sub>):38 arbitrary units(是否),辅助气(N<sub>2</sub>):7 arbitrary units,碰撞气压力(Ar):1.5 mTorr,多反应监测(MRM)参数见表 2。

表 2 质谱参数

化合物名称	监测离子对(m/z)	碰撞能量/eV	透镜电压/V
α-鹅膏毒肽	919.2 >86.0	42	199
	919.2 >258.8*	31	
β-鹅膏毒肽	920.4 >85.9	45	205
	920.4 >258.9*	31	
γ-鹅膏毒肽	903.2 >85.8	50	176
	903.2 >242.8*	31	
二羟基鬼笔毒肽	789.2 >156.9*	44	140
	789.2 >329.9	27	
羧基二羟基鬼笔毒肽	847.2 >156.9*	42	146
	847.2 >329.8	30	
羧基二羟基鬼笔毒肽	863.2 >156.8*	41	167
	863.2 >345.9	33	

注:\* 为定量离子

2 结果

2.1 条盖盔孢伞形态学鉴定

菌盖直径1~3 cm,黄褐色,具有明显可达菌盖中部的辐射状沟条,菌褶弯生。淡褐色,稀疏。菌柄顶部黄色,基部黑褐色,菌环缺失。担孢子椭圆形,具小疣和魁外膜<sup>[5]</sup>。经形态学鉴定和中国疾病预防控制中心基因测序鉴定为条盖盔孢伞(图1)。



图1 条盖盔孢伞生长采摘现场(左)和采摘后实验室(右)照片

Figure 1 Photos of *Galerina sulciiceps* picking scene (left) and back to the laboratory (right)

2.2 毒素含量分析结果

条盖盔孢伞毒素测定结果显示: $\alpha$ -鹅膏毒肽为1 690  $\mu\text{g/g}$ ; $\beta$ -鹅膏毒肽、 $\gamma$ -鹅膏毒肽、二羟鬼笔毒肽、羧基三羟基鬼笔毒肽、羧基二羟基鬼笔毒肽均未检出。 $\beta$ -鹅膏毒肽上出峰的化合物说明: $\alpha$ -鹅膏毒肽比 $\beta$ -鹅膏毒肽少一个氢原子,但在质谱检测中, $\alpha$ -鹅膏毒肽同位素准分子离子峰920.2与 $\beta$ -鹅膏毒肽准分子离子峰920.1相同,在相同的时间碎片离子共流出峰,而本研究采用梯度洗脱,将 $\alpha$ -鹅膏毒肽和 $\beta$ -鹅膏毒肽达到基线分离,互不干扰定量,所以在 $\beta$ -鹅膏毒肽离子检测通道与 $\alpha$ -鹅膏毒肽相同保留时间出峰的仍然是 $\alpha$ -鹅膏毒肽。 $\gamma$ -鹅膏毒肽上出峰的化合物说明:未知共流出物质与 $\gamma$ -鹅膏毒肽保留时间接近,通过保留时间和离子比率综合判断排除 $\gamma$ -鹅膏毒肽,而为接近时间共流出物质。色谱图见图2、3。

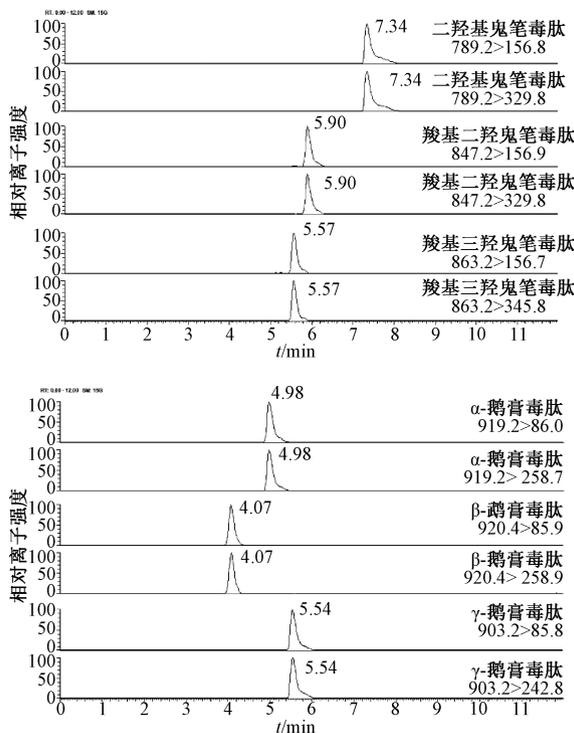
2.3 动物试验结果

2.3.1 实验小鼠体重及死亡数

实验小鼠体质量及死亡数见表3。根据实验小鼠死亡数及剂量,雌性小鼠半数致死量(LD<sub>50</sub>)为108 mg/kg BW(可信限:74.1~157 mg/kg BW)<sup>[6]</sup>。

2.3.2 实验小鼠中毒表现及大体解剖观察

464,215 mg/kg BW 剂量组小鼠腹腔注射2~3 min后,出现不安、呼吸浅快、腹壁痉挛,10~15 min后转为呆卧少动,12~24 h内全部死亡,464 mg/kg BW 剂量组小鼠死亡未取到组织;在第24 h对2只



注:标准品浓度为50 ng/mL

图2 标准品图谱信息

Figure 2 Chromatogram of a series of standard

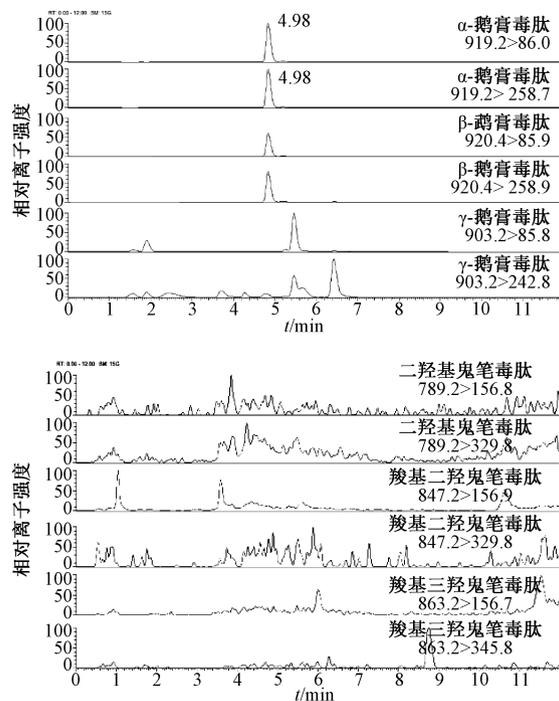


图3 条盖盔孢伞毒素测定图谱

Figure 3 Chromatogram of a series of *Galerina sulciiceps*

215 mg/kg BW 剂量组刚死亡小鼠进行大体解剖,取心、肝、脾、肺、肾、肠观察,小鼠肝叶表面发白,内有淤血,肝质不均。其余器官肉眼观察未发现异常。所有器官用福尔马林固定,进行病理检查。

100 mg/kg BW 剂量组小鼠腹腔注射5~10 min后,出现不安、呼吸浅快、腹壁痉挛,15~30 min后

表3 4个剂量实验小鼠体质量及腹腔注射条盖盔孢伞死亡数( $n=5, \bar{x} \pm s$ )Table 3 Body weight of mice in the 4 dose groups and the number of deaths by intraperitoneal injection of *Galerina sulciceps* ( $n=5, \bar{x} \pm s$ )

剂量组/(mg/kg BW)	体质量/g	死亡数/只
464	19.80±1.04	5
215	20.20±0.96	5
100	20.00±1.20	2
46.4	19.40±0.72	0

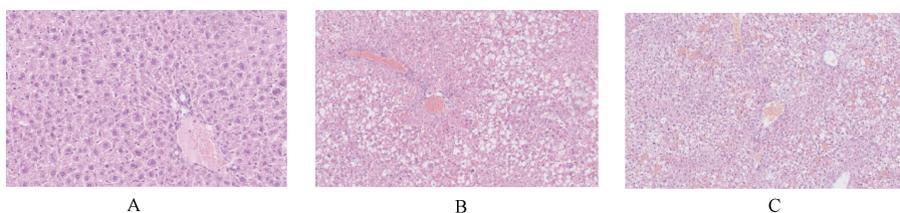
转为呆卧少动,24 h后观察到小鼠呆滞、被毛蓬松、眼睑下垂、呼吸正常或深缓。1只在28 h死亡,1只在32 h死亡,立即对小鼠进行大体解剖,取心、肝、脾、肺、肾、肠观察,小鼠肝叶有不均匀的淤血。其余器官肉眼观察未发现异常。所有器官用福尔马林固定,进行病理检查。剩余3只小鼠在观察的14 d内状态逐渐恢复正常,体质量也恢复正常。14 d观察期结束后,颈椎脱臼处死,对小鼠进行大体解剖,取心、肝、脾、肺、肾、肠,肉眼观

察未发现异常,所有器官用福尔马林固定,进行病理检查。

46.4 mg/kg BW 剂量组小鼠腹腔注射10 min后,出现与464 mg/kg BW 剂量组相同的症状,但症状较轻,在试验的14 d周期内,未观察到明显的中毒反应,体质量增长正常。14 d观察期结束后,颈椎脱臼处死,对小鼠进行大体解剖,取心、肝、脾、肺、肾、肠,肉眼观察未发现异常,所有器官用福尔马林固定,进行病理检查。

### 2.3.3 病理检查结果

空白对照组小鼠肝组织结构正常,肝小叶结构清晰,肝索排列整齐,肝细胞大小基本一致。100、215 mg/kg BW 剂量组死亡小鼠肝脏肝索和肝血窦结构消失,肝细胞空泡化明显,肝细胞肿胀、坏死,伴有出血和炎细胞浸润。随着剂量增加,病变逐渐加重(图4)。46.4 mg/kg BW 剂量组未死亡小鼠肝脏在14 d试验结束时,病理观察未发现异常。



注:A为空白对照组;B为100 mg/kg BW 剂量组;C为215 mg/kg BW 剂量组

图4 小鼠腹腔注射条盖盔孢伞水提液肝脏病理图片(HE 200×)

Figure 4 Pathological section of liver in mice by intraperitoneal injection of *Galerina sulciceps* (HE 200×)

对死亡小鼠和试验期结束处死小鼠取组织进行病理学检查,均未观察到小鼠心、脾、肺、肾、肠有病理改变。

### 2.4 结合流行病学资料分析

2019年12月贵州遵义仁怀市西南部九仓镇2名村民(夫妻)进餐误食条盖盔孢伞,出现恶心、呕吐、腹泻等症状,将患者送医院进行催吐、洗胃、排

除毒素及对症支持治疗。3 d后病情基本稳定,脱离危险,最终未出现死亡。2例患者的血液生化指标显示,中毒后肝功能指标谷丙转氨酶(aspartate aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(alanine amino transferase, AST)逐渐升高,经治疗后逐渐降低,提示肝脏受损。血清生化指标检查结果见表4。

表4 中毒事件中患者血生化指标检查结果

Table 4 Blood biochemical index test results of two patients

患者	12月7日					12月8日上午		12月8日下午		12月9日	
	ALT /(U/L)	AST /(U/L)	CK /(U/L)	HBDH /(U/L)	UA /(μmol/L)	ALT /(U/L)	AST /(U/L)	ALT /(U/L)	AST /(U/L)	ALT /(U/L)	AST /(U/L)
丈夫	116	128	91.0	280	510	348	450	536	551	137	56
妻子	37	34	63.3	222	457	85	109	870	1215	768	156

注:ALT、AST、CK、HBDH 正常范围分别为7~40、13~35、18~198、90~182 U/L,男性和女性UA 正常范围分别为149~416和89~357 μmol/L

### 3 讨论

本次中毒事件中,可疑蘑菇经基因测序结果鉴定为条盖盔孢伞,毒素分析其含有α-鹅膏毒肽1 690 μg/g,中毒人员误食条盖盔孢伞出现的肝损害血清学指标的改变最先表现为急性胃肠道反

应,毒素代谢至肝脏,肝脏生化指标ALT、AST明显升高,肝功能指标升高,出现急性肝损伤(黄疸、肝昏迷)等症状,与动物试验结果相吻合。实验小鼠肝脏病理显示,随剂量的增加,肝细胞肿胀、坏死,伴有出血和炎细胞浸润的病变逐渐加重,故条盖盔孢伞主要造成对肝脏的损伤。这与鹅膏毒素

中毒反应一致<sup>[7-8]</sup>。

条盖盔孢伞和贵州当地的黄丝菌(可食)外形相似,容易被误食<sup>[9]</sup>。不同产地的条盖盔孢伞其鹅膏毒素含量种类有所不同,据黄双等<sup>[10]</sup>报道湖南省采集的条盖盔孢伞野生子实体(干质量)中 $\alpha$ -鹅膏毒肽含量为 $868.32 \mu\text{g/g}$ , $\beta$ -鹅膏毒肽为 $406.56 \mu\text{g/g}$ ,其余鹅膏毒肽及鬼笔肽毒素未检出。本研究检测出条盖盔孢伞野生子实体(干质量)中 $\alpha$ -鹅膏毒肽含量为 $1690 \mu\text{g/g}$ ,其余鹅膏毒肽及鬼笔肽毒素未检出。

鹅膏毒肽主要中毒机制是肝损害毒素,作用机制为鹅膏毒肽经血液循环快速进入肝细胞,并与RNA聚合酶相结合,抑制mRNA的生成。鹅膏毒肽与聚合酶解离后,被排进胆汁中,随胆汁流入肠中,在小肠处被吸收,经过血液循环,又被肝脏重新吸收,从而形成肝肠循环,如此反复对肝脏造成损害<sup>[11]</sup>。《国家突发中毒事件卫生应急网络服务模式省级试点项目建议》自2016年开始执行,该项目中野生蘑菇中毒事件被定为贵州省食物中毒事件中最主要中毒危害之一<sup>[5]</sup>。研究贵州省内不同种类毒蘑菇的毒作用机制、毒素含量、毒素种类,对蘑菇中毒人群的对症治疗、缓解病情、提高中毒者的生存率具有重要意义。

## 参考文献

- [1] KIRK P M, CANNON P F, MINTER D W, et al. Dictionary of the Fungi [M]. 10th ed. Wallingford: CAB International, 2008:271.
- [2] 图力古尔,包海鹰,李玉. 中国毒菇名录[J]. 菌物学报,2014,33(3):517-548.
- [3] 周贻兵,李磊,吴玉田,等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定野生蘑菇中的3种鹅膏毒肽[J]. 现代预防医学,2018,45(22):4144-4147.
- [4] 周贻兵,李磊,吴玉田,等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定人血浆中蘑菇毒肽的含量[J]. 理化检验-化学分册,2019,55(12):1406-1411.
- [5] 周亚娟,何平,李海蛟. 贵州省蘑菇中毒防控知识手册[M]. 贵阳:贵州省科技出版社,2018:30-32.
- [6] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 急性经口毒性实验:GB 15193.3—2014[S]. 北京:中国标准出版社,2014.
- [7] 孙健,张宏顺,牛宇敏,等. 比格犬致命鹅膏急性肝毒性实验研究[J]. 中华急诊医学杂志,2016,25(12):1263-1268.
- [8] 文莉,武威桦,李丽,等. 210例急性毒蕈中毒患者的临床特征及死亡危险因素分析[J]. 中华危重病急救医学,2018,30(1):72-77.
- [9] 张宏民,叶继嵩,王伟,等. 贵州首起条盖盔孢伞菌中毒事件调查分析[J]. 黔南民族医学学报,2015,28(3):195-198.
- [10] 黄双,陈作红,张平. 条盖盔孢伞子实体及菌丝中鹅膏毒素检测[J]. 菌物研究,2015,13(3):164-167.
- [11] 蒋绍锋,何仟,张宏顺,等. 毒蕈中毒病例中毒特征分析[J]. 中国医刊,2015,50(6):63-67.

## · 公告 ·

# “献礼建党百年:合理膳食 营养惠万家”倡议书

今年是中国共产党成立100周年,是“十四五”规划的开局之年,为落实健康中国行动,国民营养健康指导委员会办公室、中国营养学会、中国学生营养与健康促进会、中国疾病预防控制中心营养与健康所、农业农村部食物与营养发展研究所、国家食品安全风险评估中心,联合发起“献礼建党百年:合理膳食 营养惠万家”倡议。

### 一、合理膳食从每个家庭做起

学习食物知识,会选食物、会看标签;一日三餐要食物多样,合理搭配;多选用原味蒸、煮、炖等健康烹调方式。重视个人和家庭日常膳食管理,把食物多样、清淡、均衡营养落实到家庭生活实践中。享受营养与美味,打好全家健康基础。

### 二、公勺公筷、分餐份餐好处多

倡导餐桌文明事,使用公勺公筷,分餐从我做起、从家庭做起、从小做起。分餐是实现合理膳食和健康生活的良好手段,同时有助于节俭节约。全家一起行动起来,形成中华饮食文化新时尚。

### 三、珍惜食物,减少浪费,人人有责

每个人、每个家庭都要积极树立文明、健康、理性、绿色的消费理念,培养形成按需购买、小份量备餐、不浪费食物的好习惯,做营养健康和合理膳食的支持者和倡导者,让“珍惜食物,减少浪费”成为每个家庭的健康生活方式,更好地支持可持续发展的健康生活。

### 四、全社会齐动员,兴饮食文明之风

学校、单位食堂、社会化餐厅,要以身作则,有计划地设计健康菜肴,减少油、盐、糖使用,少用肥肉、烟熏和腌制肉制品。倡导均衡营养和健康生活方式。

让我们积极行动起来,合理膳食、健康烹调、吃好吃好一日三餐,在全社会营造健康家庭的良好氛围,形成营养、健康、不浪费的生活方式。让营养惠及每个家庭,人人争做健康生活代言人。

食品安全标准与监测评估司

二〇二一年五月十九日

(相关链接:www.nhc.gov.cn/sps/s7886t/202105/ad05348ce6964ad880e226707b6640be.shtml)