

桔青霉毒素细胞毒性及其检测方法研究

鲁银,袁慧

(湖南农业大学动物医学院,湖南长沙 410128)

摘要:桔青霉毒素是一种真菌毒素,多存在于发霉饲料和含红曲添加剂的食品中,对人类和动物的健康有严重危害。作者总结了最近几年国内外关于桔青霉毒素的报道,从体外和体内两个角度详细的综述了桔青霉毒素的毒性和常用检测方法研究进展,为桔青霉毒素的诊断、检测和防治提供一定依据。

关键词:桔青霉毒素;毒性作用;凋亡;检测

中图分类号:Q26

文献标识码:A

文章编号:1671-7236(2012)01-0060-04

桔青霉毒素(Citrinin)是一种常见的真菌次生代谢物,多存在于霉变饲料和食品中。一直以来,桔青霉毒素中毒都是国际关注的重要问题,泰国黄变米、日本的黄酒病和意大利自然发酵香肠事件都与桔青霉毒素有关。Gordon等(2010)也在高血脂病人日常食用的4种红米中检测到桔青霉毒素含量超标,国际生命科学自然毒素检测委员会欧洲分会将桔青霉毒素列为必须检测的毒素之一。饲料中的桔青霉毒素导致肉鸡血液中不饱和脂肪酸含量升高,食品红色添加剂中桔青霉毒素致癌案例引起国际癌症研究会高度重视。目前,是否将红曲发酵产品作为未来食品着色剂还广有争议(Mapari等,2010)。桔青霉毒素主要是肾毒素,对肝脏和生殖系统也有一定的毒害作用。

1 桔青霉毒素的产生和理化性质

桔青霉毒素(Citrinin)的化学式为(3R,4S)-4,6-二氢-8-羟基-3,4,5-三甲基-6-氧-3H-2-苯吡-7-羧酸,熔点为170~173℃,蔡氏培养液中呈柠檬黄色针状菱形结晶。纯品为黄色三棱状结晶,很难溶于水,可溶于氯仿、丙酮、苯、甲醇等有机溶剂,与溴、

高锰酸钾反应呈阳性,遇三氯化铁生成浅黄色沉淀,继续反应生成褐色溶液。

在自然中,多种真菌能产生桔青霉毒素,包括青霉属中的黄绿青霉、纠缠青霉、点青霉、扩展青霉、瘦青霉、詹森青霉和曲霉属的土曲霉、白曲霉和红曲霉等。Hetherington等首次从桔青霉菌代谢产物中分离纯化了桔青霉毒素。Chen等(2008)研究结果发现,红曲霉属中能分泌桔青霉毒素的真菌都含有3个高度保守基因簇:聚酮合成酶基因 $pksCT$ 、桔青霉毒素主要生物合成酶基因 $ctnA$ 和氧化酶合成基因 $orf3$ 。桔青霉毒素的合成和分泌由菌种类型和外界环境综合决定。外界条件中,温度、湿度、pH、光线和培养基的类型都能影响桔青霉毒素的产生和产量。在MEA培养基中生长的疣状青霉菌,黄光、绿光和纯蓝光照射下赭曲霉毒素A的合成停止,桔青霉毒素却大量合成;黑暗诱导桔青霉毒素的分泌增加;白光、红光和宝蓝色光线下则不产生桔青霉毒素。扩展青霉菌是一种典型的桔青霉毒素分泌菌,但同样在给予白光、红光和宝蓝色光时发现桔青霉毒素的大量分泌(Schmidt-Heydt等,2011)。

2 桔青霉毒素毒性及其毒性机理

桔青霉毒素能对多种动物产生毒性作用,肝脏和肾脏是其靶器官。有报道称,由于肾脏和肝脏的阴阳离子通道分布较多,桔青霉毒素很可能通过这些通道大量进入肝肾细胞蓄积或引起急性中毒。桔青霉毒素对小鼠的口服半数致死量(LD₅₀)为110 mg/kg,

收稿日期:2011-07-14

作者简介:鲁银(1987-),女,湖南人,硕士生,研究方向:动物非传染群发病。

通信作者:袁慧(1947-),男,湖南人,博导,从事动物非传染群发病研究。E-mail: yuanhui7269@yahoo.com.cn; Tel:0731-84673712

from 0.56 to 35.79 U/mL between the logarithm of concentration and the diameter of inhibition zone with the 10⁶ spores/mL of test microorganism constration, the correlation coefficient was 0.9960. The proposed method has been applied to the determination of samples containing enramycin. The recoveries was 95.90%, relative standard deviation (RSD) was 1.95%. This method applies to the detection of enramycin sample.

Key words:enramycin; extraction; potency determination; microbiological assay

大鼠的 LD_{50} 为 67 mg/kg, 豚鼠的 LD_{50} 为 37 mg/kg。猪桔青霉毒素中毒的症状表现为病初往往无先驱症状, 仅食欲略减, 饮欲增加, 猪皮肤普遍潮红, 喜栖堆。继续发展, 少数猪排粥状和水样粪便, 臭味较大。病重猪卧地, 耳、腹下、四肢内侧皮肤呈兰紫色, 个别猪有颈强直现象, 口流唾液。发病较急的有呕吐现象, 十几小时死亡, 多数较缓慢, 2~3 d 内死亡。发病高潮时期全群猪站立骚动, 有轻微叫声, 呈兴奋状态。体温正常, 个别的呼吸稍快。

2.1 肾脏毒性 桔青霉毒素主要是一种肾毒素。Carlton(1979)将桔青霉毒素作为抗菌素进行检测时, 发现它对试验动物具有显著的肾脏毒性。1991 年, 在法国里昂召开的真菌毒素与地方肾病和泌尿道肿瘤研讨会上, 确定了桔青霉毒素在 Balcan 地方性肾病发生中的主要作用。桔青霉毒素中毒后肾脏主要病理表现为管状上皮细胞退化和坏死、肾脏肿大、尿量增加、血氮和尿氮升高, 并伴随有引起一系列的生理失常。体外研究结果表明, 桔青霉毒素诱导的豚鼠和兔肾小管上皮细胞损伤, 损伤部位主要集中在肾脏近曲小管细胞, 其主要的病理变化是细胞肿胀、坏死。桔青霉毒素还能抑制肾细胞的生长和肾上腺细胞的分泌功能。桔青霉毒素作用于仓鼠 RAW 264.7 细胞后, RAW 264.7 细胞的亚硝酸盐和前列腺素的分泌减少并与毒素浓度呈剂量依赖性关系, 高浓度的桔青霉毒素致使该细胞死亡(Tsai 等, 2011)。

肾细胞线粒体电子传递系统是桔青霉毒素作用的靶位点, 利用电子显微镜对体外培养的肾 BHK-21 细胞进行观察, 0.1 mmol/L 的桔青霉毒素导致线粒体肿胀、线粒体嵴透明化, 并伴随有细胞浆小泡化、细胞膜过度卷曲; 0.5 和 1.0 mmol/L 的桔青霉毒素导致细胞膜裂解, 细胞死亡。桔青霉毒素引起的急性肾坏死还与肾小管上皮细胞细胞膜功能改变有关。通过腹腔注射 60 mg/kg 的桔青霉毒素 6 h 后, 肾小管上皮细胞基底膜和刷状缘上的小泡都出现功能异常。还有研究结果表明, 桔青霉毒素通过抑制有丝分裂和炎症因子的产生, 促使肾小管细胞死亡。人胚胎肾细胞系 HEK293 染桔青霉毒素后有丝分裂指数明显下降, 细胞微管蛋白质聚合受阻, 出现结构不完整的纺锤体和畸变的染色体, 细胞周期停滞在 G2/M 期(Chang 等, 2010)。NO 是重要的炎症介导因子, 内毒素/干扰素- γ 诱导的 NO 产生从而促进炎症的发生, Liu 等(2010)研究结果发现, 桔青霉毒素能抑制这一作用, 染毒后的小鼠肾小球系膜细胞 MES-13 的 *iNOS* 基因和蛋白质表达量的

相应减少, 炎症介导和催化蛋白 STAT-1 α 和 I κ B- α 的磷酸化激活抑制, IRF-1 表达减少, NF- κ B's 和转运减少。

2.2 肝脏毒性 作为毒物的转化中心, 肝脏是桔青霉毒素攻击的靶器官。桔青霉毒素引起的肝脏损伤主要表现为肝脏肿大, 呈土黄色, 质地脆弱, 小叶清晰、中心出血。病理变化首先出现在门管区, 严重中毒时小叶区发生炎性改变。Lurá 等(2004)以每只 6 g 的剂量饲喂 Balb/C 小鼠 60 d, 小鼠肝脏指数明显下降, 红细胞压积下降, 门脉周围出现含铁血黄素颗粒; 渗透压改变, 丙氨酸转氨酶(ALTs)明显升高; 光学显微镜下, 桔青霉毒素攻毒组 10 只小鼠中, 1 只小鼠肝脏实质完全坏死, 8 只小鼠肝坏死细胞区正从门管区向小叶中心区蔓延, 1 只小叶中心细胞坏死。透射电镜观察, 肝细胞线粒体肿胀、钝圆, 线粒体内嵴增多, 基质密度增大; 门管区细胞线粒体周围油脂和其他杂质增多, 视野拥挤。还有报道称, 桔青霉毒素能通过抑制 NADH 氧化酶, NADH 还原酶, 细胞色素 C 还原酶, 苹果酸、谷氨酸及 α -酮戊二酸脱氢酶的活性, 引起跨膜电压的降低, 导致氧化磷酸化效率的降低。

与赭曲霉毒素不同, 桔青霉毒素不通过诱导肝细胞 DNA 变异, 而是通过诱导肝细胞染色体裂解破坏遗传物质, 从而破坏肝细胞的正常功能。试验结果显示, HepG2 细胞染毒后, 微核试验呈阳性, 78%~82% 着丝粒片段性受损(Knasmüller 等, 2004)。同时, 促进氧化应激也是桔青霉毒素损伤肝细胞的机制之一。HepG2 细胞染毒 24 h 后, 30 μ mol/L 桔青霉毒素组 HepG2 细胞内的活性氧簇(ROS)增加, MTT 试验显示细胞存活率下降, 同时伴有 DNA 碎片的产生。

2.3 生殖毒性 桔青霉毒素不仅损害成年动物的生殖系统, 对胚胎的发育及成长都存在有害作用, 还有一定遗传毒性。桔青霉毒素感染后, 雄性动物生殖器官结构发生改变, 精子发生和生成受阻。成年雄鼠连续 7 d 静注桔青霉毒素后, 血清中睾酮浓度明显降低。雄性器官机能异常, 睾丸、附睾、精囊和包皮腺的器官指数增加, 曲细精管长度增加。生精障碍, 精液质量下降, 活精子数少、异能精子多, 与正常雌鼠交配, 雌鼠怀孕率显著降低(Qingqing 等, 2010)。对雌性动物, 桔青霉毒素严重抑制卵母细胞成熟和受精率, 阻碍胚胎从受精卵到囊胚阶段的发育(Wen-Hsiung, 2008)。

少量桔青霉毒素能抑制胚胎发育, 导致胚胎退化,

大量染毒则造成流产、死胎、畸形胎。桔青霉毒素对鸡胚的半数致死量为每只鸡蛋 $80.5 \mu\text{g}$, 染毒鸡胚出现小眼球, 双边嘴裂, 脑症, 腹壁和室间隔缺损。Singh 等(2008)研究结果发现, 10 mg/kg 的桔青霉毒素感染妊娠大鼠不会导致胚胎死亡, 但新生儿肾脏严重病变, 肾小管、肾小囊和毛细血管丛发生各类型变性坏死, 肝脏扩张并有炎性反应。通过对小鼠胚囊发育研究结果发现, 孕期母鼠感染 $10 \mu\text{mol/L}$ 桔青霉毒素, 胚胎往往终止于 $2\sim 16$ 细胞阶段和桑椹胚阶段, 甚至退化, 仅有 26% 的胚胎发育到囊胚阶段。体外试验结果证明, 桔青霉毒素促使小鼠胚胎干细胞 ESC-B5 氧化应激, 增加活性氧(ROS)的释放, 上调热休克蛋白家族中的 HSP27、HSP70, 下调 HSP90。桔青霉毒素预处理的体外培养囊胚细胞生长分化能力下降, 囊胚滋养层细胞数锐减, 片段化 DNA 成倍增加(Wen-Hsiung, 2007)。

2.4 细胞畸变 桔青霉毒素引起的细胞畸变可能是通过对遗传物质的抑制和损伤造成的。桔青霉毒素与 DNA 结合, 抑制 RNA 聚合酶活性阻止 RNA 合成, 抑制作用与浓度呈正相关。同时, 桔青霉毒素还能提高细胞 RNA 突变率, 干扰细胞内微管的形成从而导致染色体畸变。有学者成功用桔青霉毒素诱导 344 只大鼠肾脏肿瘤。

2.5 其他毒性 目前, 桔青霉毒素毒性的报道主要在肾脏毒性、肝脏毒性和生物毒性 3 个方面。另外, 有少数研究结果发现, 桔青霉毒素对动物肠胃和骨骼也有一定损害作用。猪摄入桔青霉毒素污染的饲料后, 胃黏膜、大小结肠黏膜有出血性炎症, 表现为出血点或出血斑。桔青霉毒素还能兴奋小肠平滑肌, 使家兔小肠平滑肌的收缩幅度和张力增加。Bouslimi 等(2008)对桔青霉毒素对小鼠骨髓毒性进行了体内和体外试验, 结果发现桔青霉毒素引起该细胞 DNA 片段化增加, 小鼠骨髓细胞染色体畸变。赭曲霉毒素 A 能与桔青霉毒素协同加剧这一毒性。

3 致凋亡

现有资料表明, 桔青霉毒素诱导多种细胞凋亡, 并且凋亡与药物呈剂量—效应关系, 主要包括: 小鼠胚胎干细胞、人胚胎干细胞、人胚胎肾细胞、人早幼粒白血病细胞和人肝毒细胞瘤细胞等。目前, 研究较多的是桔青霉毒素对氧化应激的影响。3 条凋亡通路中, 桔青霉毒素通过线粒体通路诱导凋亡研究比较全面, 还未有关于内质网通路及死亡通路致凋亡的报道。Yu 等研究结果发现, 桔青霉毒素激活 HL-60 细胞 caspase-3, 6, 7, 9, 但 caspase-8 表达量

增加; 这可能指示桔青霉毒素诱导的桔青霉毒素诱导的 HL-60 细胞凋亡并不通过死亡受体通路, 但仍需进一步的证明。ESC-B5 细胞和 HepG2 细胞凋亡, ROS 增加, 线粒体膜电位(MMP)下降, 细胞色素 C 释放增多, Bax/Bcl-2 比值升高, caspase-3 激活、表达量增加(Knasmüller 等, 2004; Wen-Hsiung, 2007)。桔青霉毒素引起的 HepG2 细胞凋亡可被白藜芦醇抑制。另外, 桔青霉毒素通过促进细胞内蛋白激酶磷酸化和抑制细胞存活通过调节细胞凋亡。PAK 家族中的 PAK2 激活, JUN、ERK1/2 上调, *egr-1*、*c-fos*、*c-jun* 基因和蛋白表达上调(Chang 等, 2011), Ras 和 Raf-1 蛋白增多。桔青霉毒素诱导的凋亡可能通过 JNK 或 p38MAPK 通路(Huang 等, 2009)和抑制 Ras→ERK 通路进行。

4 青霉毒素的检测

薄层层析法(TLC)、高压液相色谱法(HPLC)和高效液相色谱—质谱联用技术是检测桔青霉毒素最常用的方法。TLC 法操作简便, 但灵敏度和特异性较差, 适用于大量样本桔青霉毒素的定性检测。HPLC 法报道最多, 该方法灵敏度高, 可达到 ng/g 水平, 但设备昂贵、操作复杂和对样品的纯度要求较高, 多用于少量样本中桔青霉毒素的检验。高效液相色谱—质谱联用技术是近几年来发展起来的分析技术, 其分离能力和高灵敏度更高, 具有应用范围广和极强的专属性等特点。Tabata 等(2008)采用高效液相色谱荧光检测法(HPLC-FL)和液相色谱串联质谱法(LC/MS/MS)检测食品中的桔青霉毒素, 两种方法性能几乎相等, 回收率达到 70%~88%, 灵敏度达到 $0.1 \mu\text{g/kg}$ 。Wu 等(2011)优化了 HPLC 法检测红麴米中桔青霉毒素的条件, $10 \text{ mL } 75\% \text{ 乙醇 } 80 \text{ }^\circ\text{C}$ 作用于红麴米 30 min 取得最好分离效果。

免疫化学方法是近十多年来发展起来的新方法, 该方法同时具备了灵敏度特异性高和操作简便两大优点, 特别适合于大批量样本的筛查, 近年来被广泛应用于桔青霉毒素的检测。免疫化学方法包括免疫标记技术、ELISA、免疫荧光技术、放射免疫技术和免疫胶体金技术等。有国外学者制作微流体电化学传感器, 利用桔青霉毒素、桔青霉毒素单克隆 IgG 抗体的抗原抗体反应和辣根过氧化酶标记的二抗的抗原抗体反应, 通过浸润在 Ag/AgCl 邻苯酚电极液的电位变化来表示大米中桔青霉素的含量(Arévalo 等, 2011); 该传感器能检测含量为 $0.5\sim 50 \text{ ng/mL}$ 范围内的桔青霉毒素样本, 单个样品耗时少于 2 min, 对检测样本纯度要求低, 变异系数小。

与色谱法相比,在时耗和敏感性方面有明显优势。抗体是免疫学方法的建立关键,纯度高、特异性强的抗体能提高检测的准确性并降低对样本纯度的要求。刘仁荣等(2007)采用活性酯法、甲醛加成法和羰基二咪唑法制备了 4 种桔青霉素与载体蛋白的偶联物(A、B、C 和 D),免疫小鼠获得杂交瘤细胞制备抗桔青霉素单克隆抗体。Zhao 等则用 BSA 包被桔青霉素后,接种鸡胚获得并纯化抗桔青霉素 IgY 卵黄抗体。获得抗体后,两者都建立了 ELISA 检测方法,灵敏度都达到 10 ng/mL,但前者线性范围较广。

参 考 文 献

- Arévalo F J, Granero A M, Fernández H, et al. Citrinin (CIT) determination in rice samples using a micro fluidic electrochemical immunosensor[J]. *Talanta*, 2011, 83(3): 966~973.
- Bouslimi A, Bouaziz C, Ayed-Boussema I, et al. Individual and combined effects of ochratoxin A and citrinin on viability and DNA fragmentation in cultured Vero cells and on chromosome aberrations in mice bone marrow cells[J]. *Toxicology*, 2008, 251(1~3): 1~7.
- Chang C H, Yu F Y, Wu T S, et al. Mycotoxin citrinin induced cell cycle G2/M arrest and numerical chromosomal aberration associated with disruption of microtubule formation in human cells [J]. *Toxicol Sci*, 2011, 119(1): 84~92.
- Chen Y P, Tseng C P, Chien I L, et al. Exploring the distribution of citrinin biosynthesis related genes among *Monascus* species [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(24): 11767~11772.
- Duan Z H, Lin Z S, Yao H R, et al. Preparation of artificial antigen and egg yolk-derived immunoglobulin (IgY) of citrinin for enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Biomed Environ Sci*, 2009, 22(3): 237~243.
- Gordon R Y, Cooperman T, Obermeyer W, et al. Marked variability of monacolin levels in commercial red yeast rice products; buyer beware[J]. *Arch Intern Med*, 2010, 170(19): 1722~1727.
- Huang Y T, Lai C Y, Lou S L, et al. Activation of JNK and PAK2 is essential for citrinin-induced apoptosis in a human osteoblast cell line[J]. *Environ Toxicol*, 2009, 24(4): 343~356.
- Knasmüller S, Cavin C, Chakraborty A, et al. Structurally related mycotoxins ochratoxin A, ochratoxin B, and citrinin differ in their genotoxic activities and in their mode of action in human-derived liver (HepG2) cells: implications for risk assessment[J]. *Nutr Cancer*, 2004, 50(2): 190~197.
- Liu B H, Chi J Y. The fungal metabolite, citrinin, inhibits lipopolysaccharide/interferon- γ -induced nitric oxide production in glomerular mesangial cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2010, 10(12): 1608~1615.
- Lurá M C, Fuentes M, Cabagna M, et al. Structural and ultrastructural alterations in BALB/c mice: effects of *Penicillium citrinum* metabolites [J]. *Mycopathologia*, 2004, 158(2): 233~238.
- Mapari S A, Thrane U, Meyer A S. Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants[J]. *Trends Biotechnol*, 2010, 28(6): 300~307.
- Schmidt-Heydt M, Rüfer C, Raupp F, et al. Influence of light on food relevant fungi with emphasis on ochratoxin producing species[J]. *Int J Food Microbiol*, 2011, 145(1): 229~237.
- Singh N D, Sharma A K, Dwivedi P, et al. Experimentally induced citrinin and endosulfan toxicity in pregnant Wistar rats: histopathological alterations in liver and kidneys of fetuses[J]. *J Appl Toxicol*, 2008, 28(7): 901~907.
- Tabata S, Iida K, Kimura K, et al. Simultaneous determination of ochratoxin A, B and citrinin in foods by HPLC-FL and LC/MS/MS[J]. *ShoKuhin Eiseigaku Zasshi*, 2008, 49(2): 100~105.
- Tsai R L, Ho B Y, Pan T M. Red mold rice mitigates oral carcinogenesis in 7, 12-dimethyl-1, 2-benz[a]anthracene-induced oral carcinogenesis in hamster[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, Published online 2011 May 4. Doi: 10. 1093/ecam/nep215.
- Wen-Hsiung C. Citrinin induces apoptosis via a mitochondria-dependent pathway and inhibition of survival signals in embryonic stem cells, and causes developmental injury in blastocysts[J]. *Biochem J*, 2007, 404(2): 317~326.
- Wen-Hsiung C. Effects of citrinin on maturation of mouse oocytes, fertilization, and fetal development *in vitro* and *in vivo*[J]. *Toxicol Lett*, 2008, 180(1): 28~32.
- Wu C L, Kuo Y H, Lee C L, et al. Synchronous high-performance liquid chromatography with a photodiode array detector and mass spectrometry for the determination of citrinin, monascin, ankaflavin, and the lactone and acid forms of monacolin K in red mold rice[J]. *J AOAC Int*, 2011, 94(1): 179~190.

The Review of Citrinin Cytotoxicity and its Detection

LU Yin, YUAN Hui

(College of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: *Citrinin* widespread in moldy feed and food with red fragment from *monascus* strains, is a kind fungi metabolites and is harmful to human and animal. This review summarized domestic and foreign reports on *Citrinin* in recent years. Aim to provide a basis for citrinin detection, precautions and poisoning diagnosis, toxicity of *Citrinin in vitro* and *in vivo* and its detection methods commonly used were overviewed.

Key words: *Citrinin*; toxicity; apoptosis; detection