

来源于胃液杂色曲霉的代谢产物分离纯化与致突变性

王殿升 上野芳夫¹ 关岛胜¹ 关田节子² 宇田川俊一² 孙鹤龄

北京市肿瘤预防研究所 北京 100034 ¹东京 理科大学药学部 ²日本国立卫生试验所

摘要 我们通过培养来源于慢性胃炎患者胃液的染色曲霉,分离制备了包括杂色曲霉素(ST)、averufin(AV)和新产物5'-hydroxy-averantin(5'-HA)等代谢产物。并检测它们及其有关衍生物的致突变性。Ames 试验表明:在0.1~100 μ g/皿剂量时,ST、O—甲基—ST、O—乙酰基—ST,不论有无S₈存在,都显示阳性结果,而AV和5'-HA只是在S₈存在时出现阳性;加S₈时5'-HA和AV对TA₉₈和TA₁₀₀菌株的致突变性强度分别是AFB₁的0.02%和0.03%、0.04%,而ST则是13.75%和38.35%。在S₈存在时ST、5'-HA、AV对CHL细胞染色体畸变阳性剂量分别是0.05、10.0、50.0 μ g/ml,不加S₈,只有ST在5 μ g/ml时就出现阳性。染色体畸变类型,ST和AV以cte为主,而5'-HA以ctb为主,据此认为新产物5'-HA和AV的致突变性,远远弱于ST和AFB₁。

关键词 杂色曲霉; 杂色曲霉素; 5'-hydroxy-averantin; averufin; 致突变性

THE PURIFICATION AND MUTAGENICITY OF METABOLITES OF ASPERGILLUS VERSICOLOR ISOLATED FROM GASTRIC JUICE

Wang Diansheng, Yoshio Ueno¹, Masaru Sekijima¹, Setsuko Sekita²,
Shun-ichi Udagawa², Sun Heling.

Beijing Institute for Cancer Research, Beijing 100034.

¹Science University of Tokyo. ²National Institute of Hygienic Sciences, Japan

Abstract *Aspergillus versicolor* isolated from gastric juice of patients with chronic gastritis was incubated. Sterigmatocystin (ST), averufin (AV) and a new metabolite 5'-hydroxy-averantin (5'-HA) were purified after these cultured samples were extracted and separated. These three metabolites and ST related compounds were examined for their mutagenicities with Ames test and chromosomal aberration assay was adopted. In Ames test, *Salmonella typhimurium* TA 98, TA100 were used, When the doses from 0.1 μ g/plate to 100 μ g/plate, ST, O-methyl-ST and O-acetyl-ST were positive no matter how S₈ mix existed or not. But AV and 5'-HA only showed positive in the presence S₈ mix. Comparing with AFB₁ in the presence of S₈ mix, the relative mutagenic activity (RMA%) to TA₉₈ and TA₁₀₀

*本研究由WHO奖学金资助

of 5'-HA were 0.02, 0.03; AV were 0.02, 0.04; ST were 13.75, 38.35. CHL cells were used in the chromosomal aberration assay. In the presence of S_0 mix, the positive dose of ST, 5'-HA and AV were 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively. Only ST was positive at 5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ level without S_0 mix. The main type of chromosomal aberration for ST and AV was cte and 5'-HA was ctb. These results suggested that the mutagenicities of AV and the new metabolite 5'-HA are weaker than that of ST and AFB_1 .

Key words *Aspergillus versicolor*; sterigmatocystin; 5'-hydroxy-averantin; averufin; mutagenicity

胃癌是我国恶性肿瘤中死亡率最高的肿瘤⁽¹⁾，全国每年约有16万人死于胃癌。至今胃癌病因尚不清，因此使胃癌防治具很大困难。1980年全国胃癌病因综合考察结果表明：慢性胃炎患者胃液中存在多种真菌，其中以杂色曲霉(*Aspergillus versicolor*)为最多，且胃癌高发区检出率明显高于胃癌低发区，具有显著性差异⁽²⁾。有资料表明人类环境和食品受杂色曲霉污染也很严重⁽³⁾。为探讨来源于胃液杂色曲霉的生物学特性，我们对包括杂色曲霉素(sterigmatocystin, 简称ST)在内的、产量较高的代谢产物，进行了分离鉴定，并用Ames试验和哺乳动物细胞染色体畸变试验，研究了其致突变性，结果报告如下。

材料和方法

材料

1. 杂色曲霉菌株：是从我们胃癌病因综考时收集的、由慢性胃炎患者胃液中分离得到的42株杂色曲霉中，通过筛选发现，产毒量较高，且其代谢产物种类具有代表性的杂色曲霉Pa菌株。

2. Ames试验所用菌株：TA₉₈, TA₁₀₀，为Ames教授赠送，由日本三菱油化BCL实验中心保存提供。

3. 哺乳动物细胞系：中国仓鼠肺成纤维细胞(CHL)，由日本厚生省细胞保存中心提供。

4. 试剂： AFB_1 从Sigma公司购入，O—甲基-ST(O-methyl-sterigmatocystin)和O—乙酰基—ST(O-acetyl-sterigmatocystin)是我们从ST合成的。其它生物用培养试剂为日水株式会社产品，有机溶剂及作为实验的阳性物为日本和光株式会社产品。

5. 培养基：葡萄糖琼脂培养基(PDA)和SSP液体产毒培养基⁽⁴⁾。

6. 仪器：日立L-6000型高效液相色谱(HPLC)仪，DC-3000型核磁共振(NMR)仪。

方法

1. 大量产毒培养：将Pa杂色曲霉菌株接种在PDA培养基上，25℃培养7d后，制成分生孢子悬液，计算孢子浓度。在装有100ml SSP液体产毒培养基的大方瓶中(容量500ml)，接种 2×10^7 个孢子后，25℃静置培养2wk，收获提取。

2. 代谢产物的提取分离及纯化鉴定：培养物用氯仿：乙腈(2：1)的混合溶剂振荡提取15min，3000r/min离心5min，分为有机层和水层，对水层再用同样溶剂和方法萃取，合并2次的有机相，旋转蒸发溶剂后为粗毒素。将粗毒素用硅胶G柱分离，首先用正己烷作流动相，然后用正己烷：二氯甲烷作流动相，不断增加二氯甲烷的比例，直到单独用二氯甲烷。最后换成二氯甲烷：乙酸乙酯混合液。根据柱的分离情况，收集不同组分的洗脱液，蒸发浓缩，最后用制备型

HPLC纯化(柱子为40×250mm Sanshus pak ODS(C₁₈)-1251-SH, 流动相是 甲醇:乙腈:水(45:30:25)。鉴定除了用 HPLC 和标准品对照外, 还以 CDCl₃ 作溶剂, 用 300 MHz的NMR作了¹H NMR和¹³C NMR 来确证。

3. Ames 试验: 按 Ames 常规方法进行, 吸取S₀Mix或缓冲液0.5ml和菌液0.1ml¹于试管中, 再加不同浓度的各种受试物0.1ml, 混匀 37℃预培养 20min后, 加入保温顶层培养液 2ml, 混匀倒在底层平板上, 待固化后, 38℃ 培养 48h, 计算回复突变菌落数。每个剂量组每个菌株同时做 3 个平皿。统计结果($\bar{x} \pm s$), 并以其平均数计算相对(相对于AFB₁)致突变活性(%) (relative mutagenic activity, RMA)

$$RMA(\%) = \frac{(Cx - Co)}{(C_{AFB_1} - Co)} \times \frac{MED_{AFB_1}}{MED_x} \times 100\%$$

Co: 阴性对照回变菌落均数。

MED: (minimum effect dose)最低效应剂量(为回变菌落数大于2倍Co时的最低致突变阳性剂量μg/皿)。

MED_{AFB₁}: AFB₁的MED。

MED_x: 对比化合物的MED。

Cx: 对比化合物在 MED_x 时的回变菌落均数。

C_{AFB₁}: AFB₁ 在 MED_{AFB₁} 时的回变菌落均数。

4. 哺乳动物染色体畸变试验⁽⁵⁾: 选用中国仓鼠肺成纤维细胞(CHL), 先测定求得受试物对 CHL 细胞 50% 生长抑制剂量(IC₅₀), 然后在此基础上, 前后选择 4 个剂量组, DMSO为溶剂, 同时作阳性和阴性对照, 分为代谢活化和不代谢活化2组, 每1种化合物均设每种浓度, 同时作 2 瓶细胞。制成标本后, 每瓶计数 100 个中期分裂相细胞, 统计染色体畸变类型及畸变细胞率(%)。

4.1 非代谢活化组: 4×10⁸/ml 细胞,

种在10%小牛血清MEM培养基中, 3d 后换液加入不同浓度的受试物, 继续培养 48h, 在收获前 3h, 加入秋水仙碱使其终浓度为 0.2μg/ml。常规方法制成标本。观察结果。

4.2 代谢活化组: 4×10⁸/ml 细胞, 种在10%小牛血清MEM培养基中, 3d 后换含有S₀ Mix 的培养基(S₀ Mix: 培养基=1:5), S₀ Mix 组成 (10ml): S₀ 3ml, 20mM Hepes 2ml, 50 mM MgCl₂ 1ml, 330 mM KCl 1ml, 50mM G-6-P 1 ml, 40mM NADP 1ml, 重蒸水 1ml。加入不同浓度的受试物作用6h后, 用PBS缓冲液洗 2 次, 再加10%小牛血清MEM培养基, 继续培养 18h 后制作标本。收获前3h加入秋水仙碱, 使其终浓度为 0.2μg/ml。常规方法制成标本, 观察结果。

结果

1. 源于胃液的杂色曲霉代谢产物的分离纯化和鉴定。

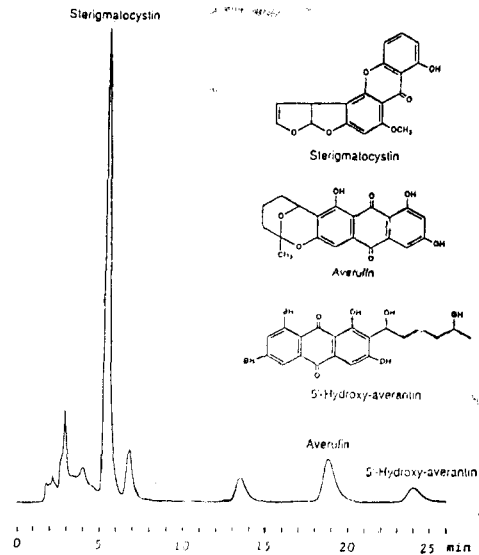


图 1 杂色曲霉Pa菌株代谢产物的HPLC图。HPLC条件: 柱子为4.6×250mm ODS(C₁₈)-1251-SH, 流动相: 甲醇:乙腈:水:乙酸=45:30:25:1, 流速: 1.5ml/min, 检测波长: 254nm。

收集保留时间为 5.35min、18.78min、

表 1 杂色曲霉代谢产物及反关衍生物的Ames试验结果

在下列剂量下(ug/皿)的回变菌落数($\bar{x} \pm S$)

受试物	S ₀	TA ₉₈										TA ₁₀₀			
		0.01	0.05	0.1	1.0	10.0	50.0	100.0	0.01	0.05	0.1	1.0	10.0	50.0	100.0
杂色曲霉素 (ST)	-	—	—	16 ± 3.6	33 ± 11.9	83 ± 7.1	90 ± 10.7	116 ± 7.8	—	—	114 ± 7.0	270 ± 22.5	624 ± 30.7	613 ± 20.3	582 ± 20.3
	+	29 ± 2.1	46 ± 9.6	84 ± 0.6	42 ± 40.1	0**	0	0	173 ± 9.8	361 ± 19.0	715 ± 43.3	63 ± 3.6	0	0	0
O-甲基-ST	-	—	—	19 ± 1.0	21 ± 1.5	103 ± 15.0	145 ± 39.2	53 ± 2.1	—	—	119 ± 9.3	152 ± 11.8	571 ± 11.7	547 ± 32.3	496 ± 68.1
	+	—	—	56 ± 1.0	348 ± 38.0	57 ± 8.1	0	0	—	—	327 ± 26.3	470 ± 23.4	0	0	0
O-乙酰基-ST	-	—	—	15 ± 4.5	16 ± 3.8	31 ± 3.8	127 ± 4.7	185 ± 10.6	—	—	105 ± 9.1	107 ± 7.5	230 ± 15.0	697 ± 31.2	701 ± 46.7
	+	—	—	76 ± 21.9	430 ± 40.1	0	0	0	—	—	637 ± 67.8	102 ± 41.7	0	0	0
Averufin	-	—	—	16 ± 2.9	19 ± 5.5	15 ± 2.0	18 ± 2.3	20 ± 6.7	—	—	113 ± 11.2	114 ± 17.4	95 ± 4.4	113 ± 16.9	109 ± 3.2
	+	—	—	21 ± 4.0	25 ± 8.4	35 ± 1.5	70 ± 9.8	119 ± 18.0	—	—	105 ± 7.6	122 ± 10.0	188 ± 4.2	372 ± 12.8	631 ± 40.7
5 ^H -Hydroxy -averantin	-	—	—	19 ± 7.2	18 ± 2.3	19 ± 7.9	19 ± 5.5	11 ± 5.0	—	—	103 ± 9.7	111 ± 9.1	120 ± 19.0	85 ± 8.4	70 ± 9.0
	+	—	—	20 ± 3.2	28 ± 8.2	35 ± 6.5	66 ± 4.0	57 ± 6.7	—	—	101 ± 2.6	105 ± 7.2	188 ± 30.4	336 ± 5.6	288 ± 9.6
AFB ₁	+	69 ± 18.5	285 ± 48.2	428 ± 152.1	—	—	—	—	239 ± 24.9	961 ± 42.2	1495 ± 38.8	—	—	—	—
	-	18 ± 0.6	—	—	—	—	—	—	149 ± 14.9	—	—	—	—	—	—
阴性对照 (DMSO)	+	29 ± 3.0	—	—	—	—	—	—	106 ± 10.1	—	—	—	—	—	—
	-	607 ± 15.5	(Δ AF-2 0.1 μ g/皿)	—	—	—	—	—	518 ± 35.0	(AF-2 0.01 μ g/皿)	—	—	—	—	—
阳性对照	+	303 ± 48.5	(Δ Δ 2-AA 0.5 μ g/皿)	—	—	—	—	—	888 ± 14.9	(2-AA 0.5 μ g/皿)	—	—	—	—	—
	-	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

*: 未测定; **: 出现毒性; Δ AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide;
 $\Delta\Delta$ 2-AA: 2-Aminoanthracene.

23.98min、3个主要组分,经纯化后,用HPLC、¹HNMR、¹³CNMR分别鉴定为ST、averufin(AV)、5'-hydroxy-averantin(5'-HA)。最后从Pa杂色曲霉的2L SSP培养液中,纯化得到纯度在99%以上的ST 79mg, AV 18mg, 5'-HA 16.8mg。

2. 杂色曲霉代谢产物及相关衍生物的Ames试验结果(表1)。

在加S₀代谢活化的情况下,ST、O-甲基-ST、O-乙酰基-ST以及5'-HA和AV对TA₉₈和TA₁₀₀菌株,都呈致突变阳性结果;在不加S₀时,5'-HA和AV在实验剂量0.1~100μg/皿范围,为阴性结果,而ST、O-甲基-ST、O-乙酰基-ST,则是阳性结果。并计算了加S₀时,相对于AFB₁的致突变活性(RMA%)(表2)。

表2 杂色曲霉代谢产物及相关衍生物相对于AFB₁的致突变活性

受试物	S ₀	TA ₉₈		TA ₁₀₀	
		MED* (μg/皿)	相对致突变活性 RMA(%)**	MED (μg/皿)	相对致突变活性 RMA(%)
杂色曲霉素(ST)	-	10.00		10.00	
	+	0.10	13.75	0.05	38.35
O-甲基-ST	-	10.00		10.00	
	+	1.00	7.98	1.10	16.62
O-乙酰基-ST	-	50.00		10.00	
	+	0.10	11.75	0.10	39.93
Averufin	-	—***		—	
	+	50.00	0.02	50.00	0.04
5'-Hydroxy-averantin	-	—		—	
	+	50.00	0.02	50.00	0.03
AFB ₁	+	0.01	100.00	0.01	100.00

*MED: 最低致突变阳性剂量; **RMA(%) 相对致突变活性(说明及计算均见正文);

***—。在本实验剂量范围未出现阳性结果。

3. 杂色曲霉代谢产物对CHL细胞的染色体畸变试验结果(表3)。

加S₀代谢活化的情况下,ST、5'-HA和AV分别在0.05、10.0、50.0μg/ml剂量时,出现阳性结果。不加S₀时,ST在5.0μg/ml时出现阳性结果,而5'-HA和AV在最高试验剂量50.0μg/ml也未见明显异常结果。从染色体畸变类型看,前3位顺序,ST是cte、ctb、gap; 5'-HA是ctb、cte、gap; AV是cte、cse、gap。

讨论

杂色曲霉可产生多种2次代谢产物,包括ST, 二氢ST, versicolorin A、B、C, AV等⁽⁶⁾。我们从杂色曲霉培养物中分离出5'-HA还属首次。有人曾在AFB₁的生化合成过程中,提及5'-HA这种中间产物⁽⁷⁾。从生化合成途径看,5'-HA、AV和ST都是AFB₁的中间体。所以杂色曲霉培养物中同时存在这3种产物。已有很多资料报道有关

表 3 杂色曲霉代谢产物对CHL细胞染色体畸变试验结果

受试物	S ₀	剂量 (μg/ml)	染色体畸变类型/200个细胞*						TAG(%)**	结果判定***
			gap	ctb	csb	cte	cse	其它		
杂色曲霉 (ST)	-	0.10	1	0	0	0	0	0	0.5	-
	-	0.50	3	0	0	0	0	0	1.5	-
	-	1.00	7	1	0	0	0	0	4.0	-
	-	5.00	40	9	0	13	1	0	28.5	++
	+	0.05	6	14	1	6	7	0	14.5	+
	+	0.10	17	16	1	15	4	0	18.5	+
	+	0.50	59	59	1	105	7	0	71.5	+++
	+	1.00	—Δ	—	—	—	—	—	—	—
Averufin	-	5.00	3	0	0	1	0	0	2.0	-
	-	10.00	3	0	0	1	0	0	2.0	-
	-	25.00	6	2	0	3	1	0	6.0	+/-
	-	50.00	1	1	0	8	0	0	5.0	+/-
	+	5.00	3	1	0	3	0	0	3.5	-
	+	10.00	4	0	0	8	1	0	6.0	+/-
	+	25.00	6	8	0	7	1	0	9.0	+/-
	+	50.00	10	7	5	39	13	1	31.5	++
5'-Hydroxy -averantin	-	5.00	2	0	0	1	0	0	1.5	-
	-	10.00	3	1	0	0	0	0	2.0	-
	-	25.00	2	1	0	2	0	0	2.5	-
	-	50.00	1	2	0	5	1	0	3.0	-
	+	5.00	1	5	0	5	0	0	5.5	+/-
	+	10.00	5	13	0	11	0	0	11.5	+
	+	25.00	7	15	0	7	1	0	15.0	+
	+	50.00	6	43	1	19	6	3	32.0	++
阳性对照ΔΔ										
MMC	-	0.025	10	12	2	94	0	0	49.5	++
DMN	+	1000	21	33	2	82	3	1	47.5	++
阴性对照	-		1	0	0	0	0	0	0.5	-
DMSO	+		1	0	0	0	0	0	0.5	-

gap: 裂隙(包括染色体和单体); ctb: 染色单体断裂; csb: 染色体断裂; cte: 染色单体交换;
cse: 染色体交换; 其它: 多倍体及粉碎性染色体。

**TAG(%): 包括gap在内的染色体畸变细胞百分数。

***结果判定: “-”0~5.0%; “+/-”5.0~10.0% “+”10~20%; “++”20~50%; “+++”50%以上。

Δ: 细胞出现毒性分裂相细胞显著减少。

ΔΔ: MMC: 丝裂霉素C; DMN: 二甲基亚硝胺。

ST的毒性及致癌、致突变作用。ST是一种因投与途径不同,可造成多种动物,不同器官肿瘤的致癌物⁽⁸⁾。而对5'-HA和AV的生物活性,文献报道很少。

我们的Ames试验结果表明:ST及其2

种衍生物不加S₀的阳性剂量大约是加S₀阳性剂量的100~500倍,其中以O-乙酰基-ST变化最大。而5'-HA和AV在本实验浓度范围,不加S₀时未出现阳性结果,加S₀后均在50.0μg/ml时出现阳性。这说明S₀代谢活化

系统具有显著增强杂色曲霉代谢产物致突变性的作用,也就是说,这些杂色曲霉代谢产物经 S_0 代谢活化后改变了原来的性状,而代谢活化后究竟转变为何种产物,有待进一步探究。结果还提示:不同菌株感受这些物质的敏感性不一样,TA₁₀₀菌株比TA₉₈菌株更为敏感,这与Ueno等的报告一致⁽⁹⁾。经过对比分析发现5'-HA、AV相对于AFB₁的致突变活性,远远不及ST及其衍生物和AFB₁强。这说明在AFB₁生化合成途径中,各种中间产物的致突变性,是逐渐增强的。

CHL细胞染色体畸变试验也显示了与Ames试验同样倾向的结果,ST在不加 S_0 时的阳性剂量(5.0 μ g/ml)是加 S_0 时(0.05 μ g/ml)的100倍。5'-HA和AV在本实验剂量范围,不加 S_0 时未出现明显阳性结果,而加 S_0 代谢活化后,分别在10.0 μ g/ml和50.0 μ g/ml时出现了阳性结果。从染色体畸变类型来见,ST主要以cte为主,AV的畸变类型以cte、cse为主,而5'-HA则以ctb为主。有人认为染色体畸变类型中cte出现频率高,可能与其致癌性有关⁽⁵⁾。

综合以上结果,部分来源于胃液的杂色曲霉除产生ST外,也可产生5'-HA和AV。

但5'-HA和AV的致突变性,远远不如ST和AFB₁强,据此可推测其致癌性可能也弱于ST和AFB₁。至于其它来源的杂色曲霉是否产生5'-HA,有待进一步研究。

参 考 文 献

1. 李冰、黎均耀.中国恶性肿瘤的死亡情况和分布特点。中华肿瘤杂志1980; 2(1): 1.
2. 孙鹤龄等.慢性胃病患者胃液内的真菌菌谱。中华肿瘤杂志1983; 5(1): 19.
3. 贾珍珍等.杂色曲霉毒素产生菌的调查研究。中华预防医学杂志1988; 22: 328.
4. Hitokoto H, et al. Chemically defined medium for high yields of sterigmatocystin. Mycopathologia 1982; 78: 99.
5. 石馆基.放射线·化学物质と染色体异常.第一版.东京:医学书院,1985: 153-165.
6. Cole RJ, Cox RJ. Handbook of toxic fungal metabolites, 1st, New York: Academic Press, 1981; 67-127.
7. 矢部希见子ほか.カフラトキシニ生合成経路ニ関ソフ.第32回マイコトキシニ研究会講演要旨集 东京, 1991.1.
8. 王殿升.杂色曲霉毒素研究进展。国外医学卫生分册1987; 2: 68.
9. Ueno Y, et al. Mutagenicity of carcinogenic mycotoxins in *Salmonella typhimurium*. Cancer Res. 1978; 38: 536.
10. Ohgaki H, et al. Carcinogenicities of heterocyclic amines in cooked food. Mutat Res 1991; 259: 399.
11. Sugimura T. Successful use of short-term test for academic purpose, their use in identification of new environmental carcinogens with possible risk for humans. Mutat Res 1988; 285: 33.
12. IARC. Overall evaluations of carcinogenicity. Suppl 7. IARC, Lyon, France, 1987
13. Gaylor DW, et al. Quantitative cancer risk assessment of heterocyclic amines in cooked foods. in: Hayatsu H (Ed) Mutagens in food, detection and prevention. CRC Press, Boca Raton, 1991; 229-236.
14. Felton JS, et al. Chemical analysis, prevention, and low level dosimetry of heterocyclic amines from cooked food. Cancer Res 1992; 52: 2103s.

(上接第14页)