

单次灌胃杂色曲霉毒素对小鼠大脑细胞的影响

刘晋红, 张祥宏*, 左连富, 严霞, 王俊灵, 黄向华, 邢凌霄, 李月红, 王凤荣
(河北医科大学实验病理室, 河北 石家庄 050017)

摘要: 目的 探讨单次 ig 杂色曲霉毒素(ST)对小鼠大脑细胞的影响。方法 采用形态学观察和流式细胞术定量检测方法,研究 ST 对 BALB/c 小鼠大脑神经细胞的影响。结果 病理形态学观察可见, ig 小剂量 ST($3 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)后 12 h 或大剂量 ST($3 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)后 6 h 即可见小鼠大脑皮质、丘脑、海马 CA2 区神经元出现胞核固缩深染、胞浆嗜酸性变、空泡变性等病理变化,且随剂量增大和作用时间延长,病变神经元逐渐增多;光镜下对海马 CA2 区病变神经元进行计数分析,结果表明 ST 处理组发生病理变化的神经元比例均高于相应对照组,且呈剂量和时间依赖性增高;流式细胞术定量检测结果表明, ig ST 3, 30, 300 和 $3000 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 12 h 后,小鼠脑细胞的凋亡率呈剂量依赖性增高; ig $3 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的 ST 后 6~48 h,随 ST 作用时间的延长,脑细胞凋亡率也明显增高。结论 经口给予 ST 可导致小鼠大脑皮质、丘脑、海马 CA2 区神经元发生退行性病变,诱导并促进小鼠大脑细胞凋亡。

关键词: 杂色曲霉毒素; 脑; 凋亡; 流式细胞术

中图分类号: R996.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2004)01-0057-05

杂色曲霉毒素(sterigmatocystin, ST)是杂色曲霉(*Aspergillus versicolor*)、构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)等真菌产生的毒性代谢产物^[1],该菌及其产物极易污染粮食、油类及各种食品,对动物和人类有明显的致癌性和致突变性^[2-5]。本研究室在进行长期诱癌

动物实验过程中发现 ST 处理组小鼠有神经系统功能障碍表现,但有关 ST 对脑组织生物学效应的研究国内外均未见报道。本研究用形态学观察和流式细胞术定量检测相结合的方法,分析 ST 对小鼠大脑神经细胞的影响,以期探讨 ST 对小鼠脑组织的生物学效应,进而对 ST 暴露对机体的危险性做出评估。

1 材料与方法

1.1 动物分组及处理

BALB/c 小鼠, 18~20 g, 雌雄各半, 清洁级, 合格证号冀医动管字第 04082 号, 由河北医科大学实验动物学部提供。ST 购自美国 Sigma 公司, 溶于生理盐水。实验分两部分进行:

实验 I: 将 30 只 BALB/c 小鼠随机分为 5 组, 分别 ig ST 0, 3, 30, 300 和 $3000 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 给药容量为 $25 \text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。ig 12 h 后将小鼠脱颈处死, 迅速取脑, 留视交叉后缘至大脑脚前缘部分, 从大脑纵裂处平均分为两部分, 分别用 10% 甲醛缓冲液和 70% 乙醇固定, 待进行形态学观察和流式细胞术检测。

实验 II: 将 48 只 BALB/c 小鼠随机分为 ST 处理组和对照组, 每组 24 只, 雌雄各半。分别 ig ST $3 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和等量生理盐水。两组小鼠分别于 ig 后 6, 12, 24 和 48 h 各取 6 只小鼠(雌雄各 3 只)脱颈处死, 立即取脑, 待测(同实验 I)。

1.2 形态学观察

常规固定、脱水、透明和石蜡包埋, 连续冠状切片, 片厚 $4 \mu\text{m}$, 普通 HE 染色, 光镜观察小鼠脑组织神经元的病理形态学变化, 并对海马 CA2 区神经元变性情况进行了计数分析。

1.3 流式细胞术定量检测

按左连富等^[6]方法制备单细胞悬液并进行细胞 DNA 染色。主要步骤如下: 将组织块在 200 目的铜网上搓, 并用磷酸缓冲盐溶液(PBS, $0.01 \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.4)向下冲洗细胞入试管内, 离心收集细胞, 经

收稿日期: 2003-01-22 接受日期: 2003-04-30

作者简介: 刘晋红(1977-), 女, 河北省石家庄市人, 在读医学硕士研究生, 主要从事肿瘤病因与肿瘤病理研究; 张祥宏(1957-), 男, 河北省巨鹿人, 教授, 博士生导师, 主要从事肿瘤病因与肿瘤病理研究。

* 联系作者 E-mail: zhangxh@hebm.u.edu.cn Tel: (0311)6266321 Fax: (0311)6043026

400 目网过滤, PBS 洗涤制成单细胞悬液, 溴化乙啶一步法进行 DNA 染色。采用美国 BD 公司生产的 FACS-420 型流式细胞仪进行 DNA 测量, 以二倍体峰前亚二倍体峰判定细胞凋亡并计算细胞凋亡率。以增殖指数 $[(S \text{ 期细胞数} + G_2/M \text{ 期细胞数}) / (G_0/G_1 \text{ 期} + S \text{ 期} + G_2/M \text{ 期细胞数}) \times 100\%]$ 表示细胞的增殖活性。

仪器光源为 2 W 氩离子激光器, 激发波长 480 nm, 工作功率 300 W, 所获数据输入 HP-300 Consort 30 计算机, 应用 BD 公司提供的相应软件程序进行资料处理。

1.4 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 所有资料均采用 SPSS 软件进行处理, 比较对照组与多个剂量组之间的差异采用方差分析, 每一时间点对照组与处理组之间的两两比较采用独立样本 t 检验, 量效与时效关系采用相关与回归分析。

2 结果

2.1 病理形态学观察

小鼠 ig 3 ~ 3000 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ST 后, HE 染色光镜观察, 对照组小鼠大脑组织未见明显异常, 神经元结构清楚, 胞核圆或卵圆形, 核膜清楚, 核染色质细腻, 可见 1 ~ 2 个明显的核仁, 胞浆略嗜碱性(图 1A)。ST 处理组大脑未见明显充血、水肿或炎症细胞浸润, 但皮质、丘脑、海马 CA2 区神经元于 ig ST 3 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 后 12 h 和 3 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 后 6 h 后即可见一定程度的退行性病变, 以海马 CA2 区最为显著, 表现为部分细胞核形状不规则, 体积缩小, 染色加深, 核膜及核仁结构不清, 胞浆嗜酸性变, 有些可见空泡变化(图 1B)。随着剂量增加和作用时间延长, 发生病变的神经元逐渐增多, 程度逐渐加重(图 1C)。光镜下对病变较明显的海马 CA2 区病变细胞进行计数分析(表 1 和表 2), 结果表明 ST 处理组发生病理变化的细胞比例均高于对照组, 且随着剂量增加和作用时间延长, 比例逐渐增高($n = 6, r = 0.718, P < 0.01$)。

2.2 ST 对小鼠脑细胞凋亡的影响

流式细胞术定量检测结果表明, ST 处理 12 h, 对照组和实验组脑细胞 DNA 二倍体峰前均可见凋亡细胞特征性的亚二倍体峰(图 2)。各剂量 ST 处理组小鼠脑细胞凋亡率均明显高于对照组, ST 剂量与脑细胞凋亡率呈明显的量效关系, 即随着 ST 剂量

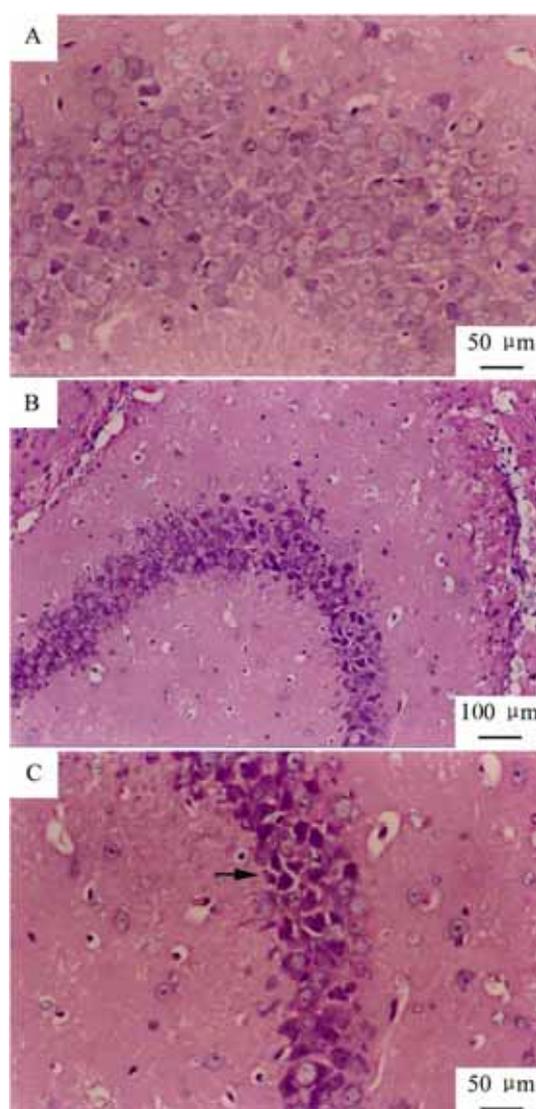


Fig 1. Microphotographs of neurons in the hippocampal CA2 area of mice. A: control, few neurons with degenerated changes could be found; B: sterigmatocystin (ST) 3 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, ig, 12 h, some neurons with degenerated changes could be seen; C: ST 3 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, ig, 48 h, many neurons with degenerated changes were present. ↓: Neurons with degenerated changes, showing the shrunken, dense-stained nuclei.

Tab 1. The percentage of degenerated neurons in hippocampal CA2 region of mice after sterigmatocystin treatment with different dosages

ST/ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	Degenerated neuron/%
0	8.3 ± 1.0
3	13.8 ± 1.5**
30	19.8 ± 1.0**
300	24.8 ± 1.7**
3000	31.8 ± 1.3**

The mice were given ig ST 12 h before the test. $\bar{x} \pm s$, $n = 6$. ** $P < 0.01$, compared with control group.

Tab 2. The percentage of degenerated neurons in hippocampal CA2 region of mice after sterigmatocystin treatment at different time

Time after ST /h	Degenerated neuron/%	
	Control	ST(3 mg·kg ⁻¹)
6	7.3 ± 0.6	26.6 ± 1.9**
12	8.3 ± 1.0	31.8 ± 1.3**
24	7.8 ± 1.1	35.9 ± 1.9**
48	8.0 ± 1.0	41.4 ± 2.9**

$\bar{x} \pm s$, $n = 6$. ** $P < 0.01$, compared with corresponding control group.

的增加其促进脑细胞凋亡的作用也增强($r = 0.693$, $P < 0.01$,表3)。以 $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 ST 处理小鼠后 6, 12, 24 和 48 h 分别检测脑细胞的凋亡情况,发现在 ST 处理后不同的时间点,实验组细胞的凋亡率均明显高于对照组,随着 ST 处理时间的延长,细胞凋亡率也随之增加,处理时间与细胞凋亡率之间存在明显的正相关关系($r = 0.618$, $P < 0.01$,表4和图3)。

2.3 ST 对小鼠脑细胞增殖的影响

流式细胞术结果表明,ST 0, 3, 30, 300 和 3000 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ig 后 12 h,脑细胞增殖指数分别为(11.0 ± 3.6)%, (12.9 ± 2.7)%, (14.7 ± 3.3)%, (16.5 ± 3.3)%和(16.7 ± 4.7)%,ST $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ig 后 6, 12, 24 和 48 h,脑细胞增殖指数分别为(12.2 ± 1.5)%, (16.7 ± 4.7)%, (11.8 ± 0.9)%和(11.5 ± 1.4)%,均较相应对照组有所增高,但差异无统计学显著性意义($n = 6$, $P > 0.05$)。

Tab 3. Effect of sterigmatocystin at different dosages on apoptosis of cerebral cells in mice

ST/ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	Apoptosis rate/%
0	3.2 ± 0.9
3	5.7 ± 1.6**
30	9.2 ± 1.4**
300	11.4 ± 1.0**
3000	13.8 ± 1.2**

ST was given ig 12 h before the test. $\bar{x} \pm s$, $n = 6$. ** $P < 0.01$, compared with control group.

Tab 4. Effect of sterigmatocystin treatment at different time on apoptosis of cerebral cells in mice

Time after ST /h	Apoptosis rate/%	
	Control	ST(3 mg·kg ⁻¹)
6	3.6 ± 0.8	12.8 ± 2.2**
12	3.2 ± 0.9	13.8 ± 1.2**
24	3.8 ± 0.9	15.7 ± 1.5**
48	4.2 ± 0.7	16.0 ± 0.9**

$\bar{x} \pm s$, $n = 6$. ** $P < 0.01$, compared with the control group at the same time.

3 讨论

探讨霉菌毒素对机体的生物学效应是阐明饮食霉菌毒素暴露危险性的重要环节。研究发现一些霉

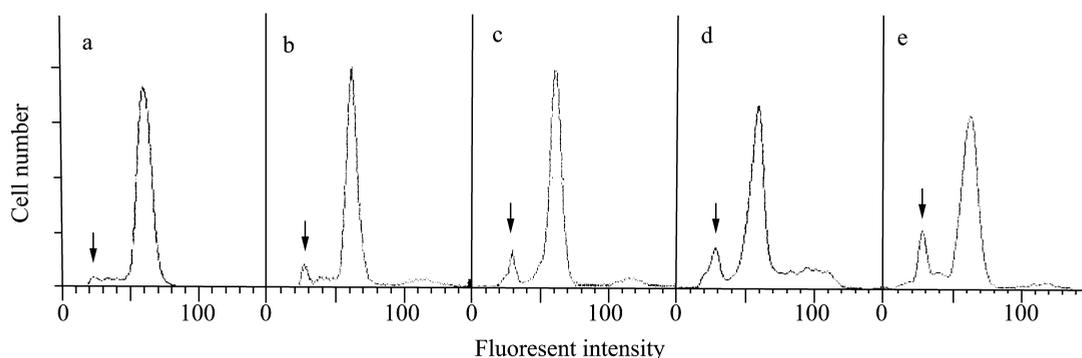


Fig 2. Apoptosis of cerebral cells in control and sterigmatocystin treatment mouse. ↓: Subdiploid apoptosis peak. a, b, c, d, e: ST 0, 3, 30, 300 and 3000 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, ig, 12 h before the test, the apoptosis rate is 3.0%, 5.0%, 8.3%, 10.7% and 13.9%, respectively.

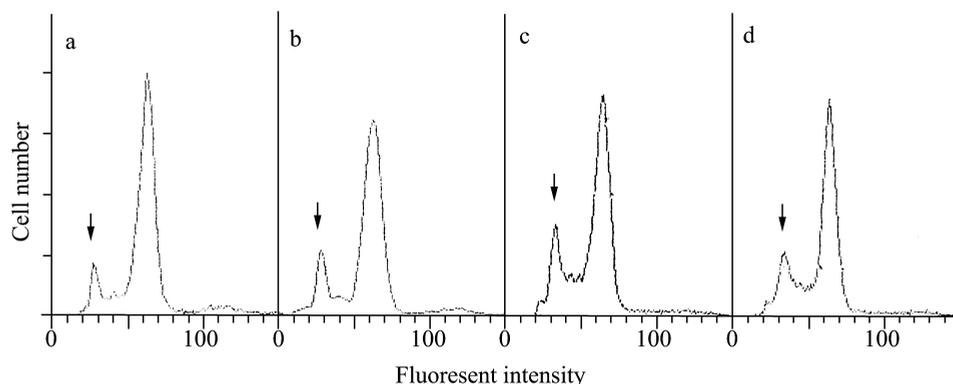


Fig 3. Effect of sterigmatocystin treatment time on apoptosis of cerebral cells in mouse. ↓: Subdiploid apoptosis peak. a, b, c, d: ST $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, ig, 6, 12, 24 and 48 h before the test, the apoptosis rate is 13.3%, 13.9%, 18.3% and 16.4%, respectively.

菌毒素对脑组织可以产生严重的损害。如引起甘蔗霉变的甘蔗节菱孢霉菌(*Arthrinium saccharicola*)可产生强烈的嗜神经毒素,患者主要表现为中枢神经系统受损^[7]。伏马毒素(烟曲霉毒素, fumonisin B₁)也可引起动物严重的多脏器病变,包括马的脑白质病变^[8]。ST是杂色曲霉菌等真菌的毒性代谢产物,通过基因毒性而致癌^[4,7],也可作为黄曲霉毒素 B₁(aflatoxin B₁, AFB₁)的前体转变成 AFB₁对动物和人类产生致癌和致突变效应。已有报道 ST 可明显诱发和加速体外培养的人外周血单个核细胞凋亡的发生,抑制白介素-2 和干扰素- γ 的分泌,从而影响机体的免疫功能;单次 ig ST 可明显促进小鼠肝肾细胞的凋亡并对睾丸和卵巢的细胞周期有明显的影[9~12]。

本研究采用形态学观察和流式细胞术定量检测相结合的方法研究经口给予 ST 后小鼠大脑细胞的变化。病理形态学观察结果发现,单次 ig 小剂量 ST ($3 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)后 12 h 或大剂量 ST ($3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)后短时间(6 h)即可导致小鼠大脑皮质、丘脑、海马区神经元出现退行性病变,以海马 CA2 区最为显著,表现为胞核形状不规则,体积缩小,染色加深,核膜及核仁结构不清,胞浆嗜酸性变,有些可见空泡变性。且随着剂量增加和作用时间延长,病变神经元逐渐增多,表明经口给予少量 ST 即可导致小鼠大脑神经元受损。

细胞凋亡是控制神经系统生长、发育动态平衡的必要手段。发育过程中的神经细胞凋亡是保证机体正常发育和维持生理过程所必需的,而分化成熟

的神经细胞凋亡过程则会引起病理性损害。在成熟的神经系统中,特定的条件(如毒素、抗原及脑内或从外周到达脑内的细胞损伤产物)可启动细胞凋亡^[13]。本研究流式细胞术结果表明,ST 可明显促进小鼠大脑细胞凋亡,且随着剂量增加及作用时间延长其促进凋亡的作用也逐渐增强,提示 ST 对小鼠大脑细胞确实有一定毒性作用。由此可能诱发小鼠脑组织功能改变,从而产生神经系统功能障碍。

杂色曲霉及其产物 ST 极易污染粮食、油类及各种食品,故有关 ST 对脑组织生物学效应的相关研究应予以重视。

4 参考文献:

- [1] Sweeney MJ, Dobson AD. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1999, **175**(2): 149 - 163.
- [2] Zhang XH, Xie TX, Zhang ZC, Yan X, Wang JL, Li SR, et al. Effects of sterigmatocystin on ras p21 expression and ultrastructure of human lung fibroblasts *in vitro*[J]. *J Hyg Res*(卫生研究), 1997, **26**(2):110 - 112.
- [3] Lou JL, Tian HJ, Meng ZH, Guo ZQ. Detection of sterigmatocystin in food/feed samples from areas with various liver/stomach cancer incidences by enzyme-linked immunosorbent assay[J]. *J Hyg Res*(卫生研究), 1995, **24**(1):28 - 31.
- [4] Xie TX, Wang FR, Tan SB, Wang JL, Zhang ZD. Sterigmatocystin induced adenocarcinoma of the lung and atypical hyperplasia of glandular stomach in mice[J]. *Chin J Oncol*(中华肿瘤杂志), 1990, **12**(1):21 - 23.

- [5] Sun HL, Wu TL, Su CY, Zhou SM, Wang KQ, Peng JG. Mycoflora in gastric juice of patients with chronic gastritis [J]. *Chin J Oncol* (中华肿瘤杂志), 1983, **5**(1):19-23.
- [6] Zuo LF. *Flow Cytometry: Technology of Sample Preparation* (流式细胞术样品制备技术) [M]. Beijing: Huaxia Publishing House, 1991. 14-19.
- [7] Hu WJ. Isolation and structural determination of sugarcane poisoning arthriniium toxicity material - 3-nitropropionic acid [J]. *Chin J Prevent Med* (中华预防医学杂志), 1986, **20**(5):321.
- [8] Riley RT, Enongene E, Voss KA, Norred WP, Meredith FI, Sharma RP, *et al.* Sphingolipid perturbations as mechanisms for fumonisin carcinogenesis [J]. *Environ Health Perspect*, 2001, **109**(Suppl 2):301-308.
- [9] Cao WJ, Sun XM, Zhang XH, Yan X, Wang JL, Wang FR. Effects of sterigmatocystin on apoptosis of human peripheral blood lymphocytes *in vitro* [J]. *Chin J Pathophysiol* (中国病理生理杂志), 1999, **15**(1):33-35.
- [10] Huang XH, Zhang XH, Yan X, Yin GR, Li YH, Tan YW, *et al.* Effects of sterigmatocystin on interferon- γ secretion of human peripheral blood mononuclear cells *in vitro* [J]. *Chin J Pathophysiol* (中国病理生理杂志), 2002, **18**(2):169-171.
- [11] Huang XH, Zhang XH, Yan X, Yin GR, Tan YW, Li YH, *et al.* Effects of sterigmatocystin on interleukin-2 secretion of human peripheral blood mononuclear cells *in vitro* [J]. *J Hyg Res* (卫生研究), 2002, **31**(2):112-114.
- [12] Huang XH, Zhang XH, Zuo LF, Li YH, Yang JZ, Liu JH, *et al.* Effects of sterigmatocystin on apoptosis and proliferation of hepatocytes in KM mice [J]. *Chin J Lab Ani Sci* (中国实验动物学杂志), 2002, **12**(2):109-112.
- [13] Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease [J]. *Science*, 1995, **267**(5203):1456-1462.

Effects of sterigmatocystin on cerebral cells in BALB/c mice after single intragastral administration

LIU Jin-Hong, ZHANG Xiang-Hong*, ZUO Lian-Fu, YAN Xia, WANG Jun-Ling,
HUANG Xiang-Hua, XING Ling-Xiao, LI Yue-Hong, WANG Feng-Rong

(Laboratory of Experimental Pathology, Hebei Medical University, Shijiazhang 050017, China)

Abstract: **AIM** To investigate the effects of sterigmatocystin(ST) on cerebral cells in BALB/c mice after single intragastral administration. **METHODS** The effect of ST, with different dosages and at different times after intragastral administration, on cerebral cells was studied with HE staining and flow cytometric (FCM) methods. **RESULTS** Pathologically, degenerated changes were observed in cortex, thalamus, hippocampus at 12 h in group with ST $3 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ig and at 6 h in group with ST $3 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ig. The nuclei in degenerated cells were shrunk in size with dark and condense chromatin staining, while the nuclear membrane and nucleoli structures were not clearly distinguished. The degenerated changes increased gradually along with the increases in ST dosage and treatment time period. The degenerated cells in the neurons of CA2 region of hippocampus was counted. The result showed that the percentage of

degenerated neurons in the ST treatment group was significantly higher than that in control group. FCM analysis revealed that 12 h after ig 3, 30, 300 and $3000 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, the apoptosis rates of cerebral cells in all ST treatment groups were significantly higher than that in control group in a dose-effect correlation fashion. Apoptosis rates also increased with treatment time 6-48 h after ig ST $3 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. **CONCLUSION** Oral ST exposure causes some degenerated changes in neurons in cortex, thalamus, CA2 of hippocampus, induces and promotes apoptosis of cerebral cells in mice.

Key words: sterigmatocystin; brain; apoptosis; flow cytometry

* Corresponding author.