

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2014.06.007

• 基础研究 •

# 赭曲霉毒素A对体外培养人胃黏膜上皮细胞染色体的损伤作用



崔晋峰, 吴莎, 刘静, 王媛, 张祥宏

**Damage Effects of Ochratoxin A on Chromosome of Human Gastric Epithelium Cells *in vitro***

CUI Jinfeng, WU Sha, LIU Jing, WANG Yuan, ZHANG Xianghong

Department of Pathology, The Second Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China

Corresponding Author: ZHANG Xianghong, E-mail: zhangxianghong2008@163.com

**Abstract: Objective** To explore the damage effect of ochratoxin A (OTA) on chromosome of human gastric epithelium cells (GES-1) *in vitro*. **Methods** The situation of chromosome damage was evaluated by micronucleus test after different concentrations of OTA treatments (5, 10, 20  $\mu\text{mol/L}$ ) for 24 h. The type of chromosome aberration was further observed by chromosome karyotypic analysis after OTA treatment at different concentrations. **Results** The micronucleus test results showed that the micronucleus rates in 10 and 20  $\mu\text{mol/L}$  OTA treatment groups were (2.90 $\pm$ 0.54)% and (3.84 $\pm$ 1.06)% respectively, which were significantly higher than that in control group [(1.23 $\pm$ 0.27)%,  $P < 0.05$ ]. Chromosome karyotypic analysis showed that total frequencies of aberrations were significantly increased after OTA treatment. The total frequencies of aberrations were 14%, 20% and 24%, respectively in 5, 10 and 20  $\mu\text{mol/L}$  OTA treated groups, which were all significantly higher than that in control group (4%,  $P < 0.05$ ). **Conclusion** OTA could increase micronucleus rate and induce chromosome aberration in GES-1 cells.

**Key words:** Ochratoxin A; GES-1 cells; Chromosome damage; Micronucleus; Gastric cancer

**摘要: 目的** 探讨赭曲霉毒素A (OTA) 对人胃黏膜上皮细胞 (GES-1) 染色体的损伤作用。**方法** 采用微核试验观察不同浓度OTA (5、10、20  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理24 h时对GES-1细胞染色体的损伤情况。利用染色体核型分析进一步观察不同剂量OTA作用后GES-1细胞染色体的畸变情况。**结果** 微核试验结果显示10和20  $\mu\text{mol/L}$  OTA处理后, GES-1细胞微核率分别为 (2.90 $\pm$ 0.54)% 和 (3.84 $\pm$ 1.06)%, 明显高于溶剂对照组 [(1.23 $\pm$ 0.27)%,  $P < 0.05$ ]。染色体核型分析表明OTA处理可以明显增加GES-1细胞染色体的畸变率, 其中5、10、20  $\mu\text{mol/L}$  OTA处理后GES-1细胞染色体总畸变率分别为14%、20%和24%, 明显高于溶剂对照组4%。**结论** OTA处理可以增加GES-1细胞微核的形成, 诱导GES-1细胞染色体发生畸变。

**关键词:** 赭曲霉毒素A; GES-1细胞; 染色体损伤; 微核; 胃癌

**中图分类号:** R735.2 **文献标识码:** A

## 0 引言

赭曲霉毒素A (ochratoxin A, OTA) 是由曲霉属和青霉菌属的某些菌株产生的一种真菌毒素, 其污染非常普遍, 广泛存在于小麦、玉米、豆类等粮食作物以及咖啡、葡萄酒、啤酒、面包

等食品中<sup>[1-3]</sup>。目前体外研究已经发现OTA具有肾毒性、肝毒性、神经毒性、免疫毒性等生物学效应, OTA可以抑制人肾小管上皮细胞的生长<sup>[4]</sup>、诱导肝细胞DNA的氧化应激损伤<sup>[5]</sup>、损伤海马神经元细胞<sup>[6]</sup>、扰乱胃肠道黏膜屏障、破坏胃肠道黏膜细胞间的紧密连接和信息传递<sup>[7]</sup>、抑制体外培养的T和B淋巴细胞增殖, 并且可以减少IL-2和IL-2受体的产生<sup>[8]</sup>。此外, 动物实验还发现, OTA具有致畸性、致突变性和致癌性, 如孕鼠灌喂OTA后可以引起胎鼠脑积水、小眼畸形、肾发育不全<sup>[9]</sup>; 长期食用OTA污染的饲料, 可以诱发F344/N大鼠出现肾脏肿瘤、肝脏肿瘤、前胃上皮细胞增生、乳腺纤维腺瘤等<sup>[10]</sup>。1993年国际癌症研究中心将OTA

收稿日期: 2013-04-29; 修回日期: 2013-08-05

基金项目: 国家自然科学基金资助面上项目 (81171889); 国家自然科学基金青年科学基金资助项目 (81301695); 河北省自然科学基金青年科学基金资助项目 (H2012206053)

作者单位: 050000 石家庄, 河北医科大学第二医院病理科

通信作者: 张祥宏, E-mail: zhangxianghong2008@163.com

作者简介: 崔晋峰 (1980-), 女, 博士, 主治医师, 主要从事肿瘤病因与肿瘤病理方面的研究

列为“可能的人类致癌物”<sup>[11]</sup>。

河北省赞皇县是我国胃癌高发区之一，胃癌年均死亡率超过59/10万<sup>[12-13]</sup>。2006年，我们对当地居民粮食中OTA的污染状况进行了现场调查，发现当地居民食用的小麦中OTA的检出率为45.16%，平均含量为2.41 μg/kg，明显高于国内其他地区的检测结果（我国六省区OTA平均污染浓度0.60 μg/kg），而且当地居民OTA的日暴露量（1.17 μg/kg）明显高于世界卫生组织/粮农组织联合专家委员会（joint FAO/WHO expert committee on good additives, JECFA）暂定的每周容许摄入量（100 ng/kg）<sup>[14]</sup>。鉴于OTA在胃癌高发区粮食中的高污染以及对人类的可能致癌性，使得探讨OTA与胃癌发生的可能关系变得非常重要。因此本部分研究首先利用微核试验初步观察OTA对GES-1细胞染色体的损伤情况；接着利用染色体核型分析进一步观察OTA作用后GES-1细胞染色体的畸变情况，为揭示OTA暴露与人胃黏膜损伤乃至胃癌发生的可能关系提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

永生化人胃黏膜上皮细胞（GES-1）购自北京肿瘤研究所；OTA购自德国ALEXIS公司，用甲醇（色谱纯）将其溶解，配制成10 g/L的储存液，4℃保存，临用时稀释；DMEM培养液购自美国Gibco公司；新生牛血清购自四季青公司；秋水仙碱购自上海化学试剂厂；冰乙酸购自天津市化学试剂三厂；甲醇购自天津市凯通化学试剂公司；胰蛋白酶购自美国Sigma公司。

### 1.2 实验分组

取对数生长期GES-1细胞，随机分组，实验组给予OTA，使其终浓度分别为5、10、20 μmol/L；同时设溶剂对照组（甲醇，终浓度为0.08%）。各组细胞处理后继续培养24 h，然后收集进行微核试验和染色体核型分析。

### 1.3 微核试验检测OTA对GES-1细胞微核率的影响

5、10、20 μmol/L OTA处理GES-1细胞24 h后，胰酶消化收集细胞，1500 r/min离心5 min，细胞沉淀用0.075 mol/L KCl低渗液处理，然后用3:1甲醇冰醋酸固定液固定3次，最后用少量固定液将细胞沉淀制成悬液，滴2滴于冰冻的洁净玻片上，室温下自然干燥，用吉姆萨（Giemsa）染色，光学显微镜下观察，在双盲条件下计数1 000个细胞中含有微核的细胞数，微核率（%）=含微核细胞数/观察的细胞总数×100%。

### 1.4 染色体核型分析检测OTA对GES-1细胞有丝分裂中期染色体核型的影响

不同浓度OTA处理GES-1细胞24 h后，加入秋水仙素（终浓度为0.05 μg/ml），继续培养3 h，1 000 r/min离心10 min收集细胞，吸上清液，逐滴加入预热至37℃的KCl（0.075 mol/L），轻轻混匀，37℃水浴孵育40 min，新鲜固定液（3:1甲醇冰醋酸）固定。取冷冻的载玻片，距玻片15 cm高度处向玻片滴1~2滴细胞悬液，于75℃烤箱中，烤片3 h。Giemsa染色，中性树胶封片。每组选择100个染色体分散良好、形态清晰的中期分裂相，油镜下观察、记录染色体数目、染色体形态异常（如：双着丝粒、间隙、断裂、环状）等染色体畸变类型及频度，并与溶剂对照组比较。

### 1.5 统计学方法

数据采用SPSS 13.0软件包进行统计学处理，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。微核实验数据用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示，进行单因素方差分析（ANOVA），对所测定结果进行正态性及方差齐性检验。染色体畸变率各组之间的比较采用 $\chi^2$ 检验。

## 2 结果

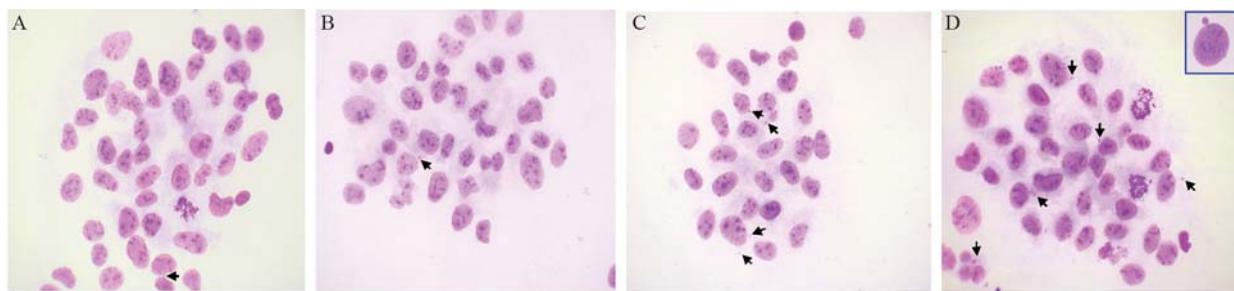
### 2.1 OTA对GES-1细胞微核率的影响

光学显微镜下可见GES-1细胞呈圆形，胞核和胞质显色清楚。对照组细胞很少出现微核[微核率为 $(1.23 \pm 0.27)\%$ ]，见图1A；随着OTA处理浓度的增加，出现微核的细胞数逐渐增多，见图1B、1C、1D。随着OTA处理浓度的增加，GES-1细胞微核率逐渐增加，其中10 μmol/L和20 μmol/L OTA处理组的细胞微核率分别为 $(2.90 \pm 0.54)\%$ 和 $(3.84 \pm 1.06)\%$ ，明显高于溶剂对照组 $[(1.23 \pm 0.27)\%$ ， $P < 0.05$ ]，提示OTA处理可以诱导GES-1细胞染色体的损伤。

### 2.2 OTA对GES-1细胞有丝分裂中期染色体核型的影响

GES-1细胞经5、10和20 μmol/L OTA处理24 h后，结构异常的染色体与溶剂对照组相比明显增多，尤其以20 μmol/L OTA处理组增多明显。其中，染色体结构异常（间隙、断裂、缺失、环状染色体）的发生率随OTA处理浓度的增加而增多，见图2。5、10和20 μmol/L OTA处理组染色体总畸变率分别为14%、20%和24%，明显高于溶剂对照组（4%， $P < 0.05$ ），见表1。而且还发现，在20 μmol/L OTA处理组中，一个细胞有丝分裂中期的染色体可以同时发生两种或三种畸变。该结果进一步证实OTA处理可以诱导GES-1细胞染色体畸变。

不同浓度OTA处理24 h后GES-1细胞中期分裂相出现的双着丝粒、间隙、断裂、环状等异常染色体结构，见图2。



Micronucleus(MN) assay showed representative micronucleus cell by Giemsa staining( $\times 400$ ). A: solvent control group; B: 5 $\mu\text{mol/L}$  treatment group; C: 10 $\mu\text{mol/L}$  OTA treatment group; D: 20 $\mu\text{mol/L}$  OTA treatment group. The arrows ( $\uparrow$ ) represented the MN of GES-1 cells in groups; OTA: ochratoxin A

图1 赫曲霉素A诱导GES-1细胞微核形成

Figure1 Induction of micronucleus by OTA in GES-1 cells

表1 染色体核型分析检测OTA对GES-1细胞有丝分裂中期染色体核型的影响 (%)

Table1 Effects of OTA on frequencies of chromosome aberrations in GES-1 cells detected by metaphase chromosome karyotype analysis (%)

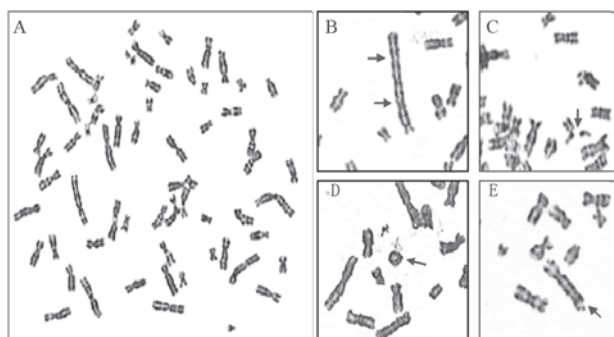
Groups	Dicentric	Gaps	Breaks	Ring	Polyplloid	Total
Solvent control	2	0	0	0	2	4
5 $\mu\text{mol/L}$ OTA	3	3	5	0	3	14*
10 $\mu\text{mol/L}$ OTA	5	4	5	2	4	20*
20 $\mu\text{mol/L}$ OTA	11	8	5	0	5	24*

Notes: chi-square test. \* $P < 0.05$ , compared with control group

### 3 讨论

前期研究中发现OTA可以诱导GES-1细胞发生氧化DNA双链损伤以及细胞周期紊乱<sup>[15-16]</sup>。DNA被认为是致癌性物质攻击的主要靶分子，而DNA双链断裂是最严重的DNA损伤形式，它能够使细胞的正常生命活动乃至生存都受到严重威胁，是发生基因突变、染色体断裂的主要原因之一。因为断裂DNA双链如果未被修复或进行了不恰当修复，可能会导致染色体缺失、重排、转位和倒置等现象，进而基因组会发生不稳定，易于形成肿瘤<sup>[17]</sup>。研究表明，很多致癌物，包括致癌性真菌毒素都可以引起细胞DNA损伤以及染色体畸变：致癌性细菌幽门螺旋杆菌可以诱导细胞发生DNA损伤以及染色体畸变<sup>[18]</sup>；黄曲霉毒素能够诱导啮齿类动物和人类细胞染色体畸变，染色体的姐妹染色单体互换，染色体断裂等<sup>[19]</sup>。

已有研究发现：OTA可以诱导大鼠肾细胞微核形成<sup>[20]</sup>；同时OTA诱导的染色体畸变可能和巴尔干肾病的发生有关<sup>[21]</sup>。但目前有关OTA对人胃黏膜上皮细胞染色体影响的研究国内外未见报道。本研究采用微核试验和染色体核型分析深入探讨了不同浓度OTA处理对GES-1细胞染色体的影响。微核试验结果发现，在0~20  $\mu\text{mol/L}$ 的浓度范围内，随着OTA处理浓度的增加GES-1细胞微核形成率逐渐增加，尤其以10和20  $\mu\text{mol/L}$  OTA处理组



A: a metaphase mitotic figure in solvent control group; B: dicentric chromosome; C: breaks chromosome; D: ring chromosome; E: gap chromosome. Chromosome aberrations ( $\uparrow$ ) were apparent in OTA treatment group

图2 OTA对GES-1细胞有丝分裂中期染色体核型的影响

Figure2 Effects of OTA on metaphase chromosome karyotype in GES-1 cells

细胞微核形成率增加明显，提示OTA处理可以诱导GES-1细胞染色体的损伤。微核试验虽然操作快速、简便，但这种试验方法有其局限性，只能间接反映染色体的损伤程度，并不能直观的观察染色体的损伤类型。我们采用染色体核型分析进一步观察了OTA对GES-1细胞染色体畸变率的影响，结果发现GES-1细胞经不同剂量OTA处理后，各种类型的畸变染色体（双着丝粒染色体、染色体间隙、染色体断裂、环状染色体和多倍体）的发生率均较溶剂对照组有所增加，较大剂量OTA处理后GES-1细胞染色体总畸变率明显增多。综上所述可见OTA可以增加GES-1细胞微核的形成，诱导GES-1细胞染色体发生畸变。

近来有学者通过大样本调查研究发现，人外周血淋巴细胞的微核发生率可以预测癌症发生的风险，因此微核被认为是细胞癌变的早期事件<sup>[22]</sup>。而染色体畸变则被认为是肿瘤发生的一个重要因素。染色体在畸变过程中会发生染色体重排和基因扩增，进而使细胞发生癌变。Gandhi等<sup>[23]</sup>认为人乳头状甲状腺癌的发生是由于某一特定位置的染色体发



生易位而形成的。de Klein等<sup>[24]</sup>认为9号染色体易位可以使癌基因异常激活,从而导致慢性粒细胞白血病的发生。本研究结果发现OTA可以增加人胃黏膜上皮细胞的微核发生率,同时导致细胞染色体出现各种类型的畸变。研究结果表明OTA可能会通过导致人胃黏膜上皮细胞染色体畸变,进而使细胞发生恶性转化。因此,我们认为粮食中OTA的高污染可能会对胃癌高发区居民胃癌的发生发挥一定作用,这应当引起肿瘤防治工作者的重视。本研究加深了对OTA生物效应的认识,为OTA暴露的合理处置奠定了科学基础,为胃癌的合理防治提供了科学依据,对提高我国农村居民,特别是胃癌高发区居民食品安全水平具有重要意义。

#### 参考文献:

- [1] Ferrante MC,Raso GM,Bilancione M,*et al.*Differential modification of inflammatory enzymes in J774A.1 macrophages by ochratoxin A alone or in combination with lipopolysaccharide[J]. *Toxicol Lett*,2008,181(1):40-6.
- [2] Kamp HG, Eisenbrand G, Janzowski C, *et al.* Ochratoxin A induces oxidative DNA damage in liver and kidney after oral dosing to rats[J]. *Mol Nutr Food Res*,2005,49(12):1160-7.
- [3] Wilk-Zasadna I, Minta M. Developmental toxicity of ochratoxin a in rat embryo midbrain micromass cultures[J].*Int J Mol Sci*,2009,10(1):37-49.
- [4] Heussner AH,O'Brien E,Dietrich DR.Effects of repeated ochratoxin exposure on renal cells *in vitro*[J].*Toxicol In Vitro*,2007,21(1):72-80.
- [5] Cavin C,Delatour T,Marin-Kuan M,*et al.*Ochratoxin A-mediated DNA and protein damage: roles of nitrosative and oxidative stresses[J].*Toxicol Sci*,2009,110(1):84-94.
- [6] Sava V,Velasquez A,Song S,*et al.*Adult hippocampal neural stem/progenitor cells *in vitro* are vulnerable to the mycotoxin ochratoxin-A[J].*Toxicol Sci*,2007,98(1):187-97.
- [7] Ranaldi G,Mancini E,Ferruzza S,*et al.*Effects of red wine on ochratoxin A toxicity in intestinal Caco-2/TC7 cells[J]. *Toxicol In Vitro*,2007,21(2):204-10.
- [8] Pfohl-Leskowicz A, Manderville RA.Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans[J].*Mol Nutr Food Res*,2007,51(1):61-99.
- [9] Patil RD,Dwivedi P,Sharma AK.Critical period and minimum single oral dose of ochratoxin A for inducing developmental toxicity in pregnant Wistar rats[J].*Reprod Toxicol*,2006,22(4):679-87.
- [10] Pfohl-Leskowicz A, Manderville RA.Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans[J]. *Mol Nutr Food Res*,2007,51(1): 61-99.
- [11] International Agency for Research on Cancer. Ochratoxin A[C]// IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to

Humans,Lyon, France:IARC,1993:489-521.

- [12] Zhang X,Xue L,Xing L,*et al.*Low serum pepsinogen I and pepsinogen I/II ratio and helicobacter pylori infection are associated with increased risk of gastric cancer: 14-year follow up result in a rural Chinese community[J]. *Int J Cancer*,2012,130(7): 1614-9.
- [13] Zhao CY, Zhang XH, Xue LY, *et al.* Analysis of the changing trends of frequency and localization of gastric cancers arising from different sites of the stomach in population of the high incidence area of esophageal and gastric cancers in Hebei province[J]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*,2008,30(11):817-20. [赵晨燕, 张祥宏, 薛丽英, 等. 河北省食管癌和胃癌高发区居民胃癌发生部位的变化及趋势分析[J].*中华肿瘤杂志*,2008,30(11):817-20.]
- [14] Li Z,Zhang X, Cui J,*et al.*Assessment on pollution of Ochratoxin A in grain in China and its apoptosis effect on *in vitro*-cultured human tubular kidney cells[J].*J Biochem Mol Toxicol*,2012,26(4):139-46.
- [15] Cui J, Xing L, Li Z, *et al.* Ochratoxin A induces G(2) phase arrest in human gastric epithelium GES-1 cells *in vitro*[J]. *Toxicol Lett*,2010,193(2):152-8.
- [16] Cui J, Liu J, Wu S, *et al.* Oxidative DNA damage is involved in ochratoxin A-induced G2 arrest through ataxia telangiectasia-mutated(ATM) pathways in human gastric epithelium GES-1 cells *in vitro*[J]. *Arch Toxicol*,2013,[Epub ahead of print].
- [17] Asaithamby A,Hu B,Delgado O,*et al.*Irreparable complex DNA double-strand breaks induce chromosome breakage in organotypic three-dimensional human lung epithelial cell culture[J].*Nucleic Acids Res*,2011,39(13):5474-88.
- [18] Toller IM,Neelsen KJ,Steger M,*et al.*Carcinogenic bacterial pathogen *Helicobacter pylori* triggers DNA double-strand breaks and a DNA damage response in its host cells[J].*Proc Natl Acad Sci U S A*,2011,108(36):14944-9.
- [19] Wang JS, Groopman JD. DNA damage by mycotoxins[J].*Mutat Res*,1999,424(1-2):167-81.
- [20] Robbiano L,Baroni D,Carrozzino R, *et al.* DNA damage and micronuclei induced in rat and human kidney cells by six chemicals carcinogenic to the rat kidney[J].*Toxicology*,2004,204(2-3):187-95.
- [21] Manolov G, Manolova Y, Castegnaro M, *et al.* Chromosomal alterations in lymphocytes of patients with Balkan endemic nephropathy and of healthy individuals after incubation *in vitro* with ochratoxin A[J]. *IARC Sci Publ*,1991,(115):267-72.
- [22] Bonassi S, El-Zein R, Bolognesi C, *et al.* Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies[J]. *Mutagenesis*,2011,26(1):93-100.
- [23] Gandhi M, Dillon LW, Pramanik S, *et al.* DNA breaks at fragile sites generate oncogenic RET/PTC rearrangements in human thyroid cells[J]. *Oncogene*,2010,29(15):2270-80.
- [24] de Klein A, van Kessel AG, Grosveld G, *et al.* A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia[J]. *Nature*,1982,300(5894):765-7.

[编辑: 黄园玲; 校对: 杨 卉]